



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

ANNA LUISA DE CARVALHO BRITO

PROSPECÇÃO DE BIOATIVOS EXTRACELULARES DE HOLOBIONTES
FÚNGICOS DE MACROALGAS MARINHAS

FORTALEZA

2024

ANNA LUISA DE CARVALHO BRITO

PROSPECÇÃO DE BIOATIVOS EXTRACELULARES DE HOLOBIONTES FÚNGICOS
DE MACROALGAS MARINHAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Oscarina Viana de Sousa.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B875p Brito, Anna Luisa de Carvalho.
Prospecção de bioativos extracelulares de holobiontes fúngicos de macroalgas marinhas / Anna Luisa de Carvalho Brito. – 2024.
85 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

Coorientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Metabólitos fúngicos. 3. Extratos fúngicos. I. Título.

CDD 551.46

ANNA LUISA DE CARVALHO BRITO

PROSPECÇÃO DE BIOATIVOS EXTRACELULARES DE HOLOBIONTES FÚNGICOS
DE MACROALGAS MARINHAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 11/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cléberon de Freitas Fernandes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof. Dr^a. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Jessica Lucinda Saldanha da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Rosa Helena Rebouças
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre presente na minha vida, de tantas formas que não tenho dúvidas que foi graças às suas bênção que cheguei até aqui. Aos meus pais, Evani de Carvalho Brito e Domingos Brito, por todo investimento, empenho, amor e carinho sem medidas que sempre me ofertaram. Agradeço também aos meus irmãos Bruno e Ciro Brito que juntamente com meus pais, são meu ponto de apoio. Gostaria de agradecer também ao meu namorado Tadeu Azevedo por todo carinho e ajuda, que foram essenciais para que eu tivesse forças para finalizar esta jornada. Agradeço a toda minha família, pelo suporte, motivação e companheirismo, vocês são o pilar da minha vida.

Ao meu orientador Bartolomeu Souza, muito obrigada por aceitar orientar esta pesquisa, pelo empenho em fazer dar certo e disponibilidade sempre que preciso. Agradeço também à minha co-orientadora Oscarina Sousa, que foi essencial na realização deste projeto, obrigada, por me motivar, pela paciência e disponibilidade, e por oferecer condições para que este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço ainda a todos no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado pela companhia, pelo espírito de equipe, pelas muitas horas que dividimos momentos de trabalho e diversão, e por todo ensinamento, pois conviver com cada um de vocês é um ensinamento que vou levar para a vida.

Não poderia deixar de agradecer a um grande colaborador para execução deste projeto, e de vários projetos pessoais, Wesley Paiva, que é uma luz na minha vida, sempre com as palavras certas, nas horas certas.

Gostaria de agradecer à EMBRAPA, e especialmente nas pessoas do Dr. Paulo Riceli, e Dr. Kirley Canuto, que contribuíram de forma atenciosa com etapas do processos metodológico. Agradeço ainda ao apoio das agências de financiamento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro aos projetos desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE), e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Estendo meus agradecimentos também à banca examinadora Cléberson Fernandes, Gleire Menezes, Jéssica Silva e Rosa Rebouças por compartilharem o conhecimento de vocês na evolução deste projeto.

A todos, meu muito obrigada.

RESUMO

A resistência antimicrobiana tem ocasionado perda de vidas e severos prejuízos econômicos em escala global. Para desacelerar o desenvolvimento de resistência microbiana aos fármacos, são necessárias medidas multissetoriais. No que tange à pesquisa científica, o desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas pode reduzir o avanço de microrganismos multirresistentes. Fungos são historicamente fontes de moléculas com atividades biológicas, a partir de células fúngicas foi criado o primeiro antibiótico conhecido pela humanidade, e até hoje, organismos desse reino são utilizados como fonte de bioativos. A interação entre as espécies presentes no microbioma com os organismos hospedeiros pode influenciar na produção e atividade desses bioativos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi fazer a prospecção de bioativos a partir de fungos pertencentes a microbiota de cinco espécies de macroalgas marinhas, e caracterizar estes fungos e o potencial inibitório de seus bioativos produzidos. A análise do potencial inibitório foi feita via *agar plug test*, e foram utilizados na produção de extratos orgânicos com acetato de etila. Esses extratos tiveram seus índices inibitórios medidos a partir da CIM, CBM, e IC50. Os extratos com melhores índices inibitórios tiveram os fungos produtores identificados, e a composição do extrato analisada pelo sistema UPLC acoplado a detectores de massas quadrupolo. Dos 24 fungos isolados, 11 exerceram halos de inibição contra cinco espécies de cepas padrão patogênicas, e foram utilizados na produção dos extratos fúngicos. Seis dos extratos exerceram inibição estatisticamente significativa contra as cepas bacterianas padrão *E. coli* e *V. cholerae*. O extrato E1 foi considerado o de melhor potencial inibitório por ter apresentado as menores concentrações para exercer efeito inibitório. A inibição apenas em microrganismos da classe dos Gram negativos é um fator importante no desenvolvimento de antimicrobianos com menor potencial de indução de resistência bacteriana. O composto pensulfonoxy foi identificado em 5 dos 6 extratos inibitórios, e já foi reportado na literatura como bioativo de capacidade antimicrobiana, tendo sido portanto, o provável composto causador da inibição. O presente estudo mostra uma variedade de fungos marinhos ainda pouco explorados, e seu potencial na descoberta de novas moléculas antimicrobianas com ações direcionadas a bactérias Gram-negativas, que configuram uma classe prioritária a ser combatida segundo dados da Organização Mundial da Saúde.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana; metabólitos fúngicos; extratos fúngicos.

ABSTRACT

Over the years, resistance to antibiotics has caused millions of deaths and severe economic losses on a global scale. Multisectoral efforts are thus warranted in order to curb the phenomenon of antimicrobial resistance, and it falls to scientific research to develop novel molecules designed to hold off the advancement of multiresistant microorganisms. Fungi are historically sources of molecules with biological activities, the first antibiotic known to humanity was created from fungal cells, and to this day, organisms from this kingdom are used as a source of bioactives. The interaction between species present in the microbiome and host organisms can influence the production and activity of these bioactives. Therefore, the aim of this work was to prospect for bioactives from fungi belonging to the microbiota of five species of marine macroalgae, and to characterize these fungi and the inhibitory potential of their produced bioactives. The inhibitory potential analysis was carried out via agar plug test, and was used in the production of organic extracts with ethyl acetate. These extracts had their inhibitory indices measured on MIC, MBC, and IC₅₀. The extracts with the best inhibitory indexes had the producing fungi identified, and the composition of the extract analyzed by the UPLC system coupled to quadrupole mass detectors. 24 fungi were isolated, 11 exerted inhibition halos against five species of pathogenic standard strains, and were used in the production of fungal extracts. Six extracts exerted statistically significant inhibition against standard strains of *E. coli* and *V. cholera*. The E1 extract was considered to have the best inhibitory potential as it presented the lowest concentrations to exert an inhibitory effect. Inhibition only of Gram-negative microorganisms is an important factor in the development of antimicrobials with less potential for inducing bacterial resistance. Pensulfonoxy was identified in 5 out of the 6 inhibitory extracts, and has already been reported in the literature as a bioactive with antimicrobial capacity, and was therefore the probable compound causing the inhibition. The present study shows a variety of marine fungi that are still poor explored, and their potential as source of new antimicrobial molecules with actions directed at Gram-negative bacteria, which constitute a priority class to be dealt according to data from the World Health Organization.

Keywords: antimicrobial resistance; fungal metabolites; fungal extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Registro de quantidade de patentes relacionadas a extratos fúngicos nos últimos 10 anos na plataforma internacional WIPO	23
Figura 2 -	Identificação do local onde foi realizada a coleta das macroalgas marinhas	26
Figura 3 -	Esquematização dos componentes presentes na placa de 96 poços para o teste de microdiluição em caldo. Estão representados na figura as concentrações testadas, onde cada amostra se localiza na placa, a representação de duas amostras, e onde foi adicionado os controles positivo e negativo	29
Figura 4 -	Fluxograma de resumo dos processos metodológicos aplicados	31
Figura 5 -	Imagens a-e das algas identificadas respectivamente como: <i>Ulva fasciata</i> (a), <i>Cryptonemia crenulata</i> (b), <i>Caulerpa racemosa</i> (c), <i>Gracilaria ferox</i> (d), <i>Padina gymnospora</i> (e)	33
Figura 6 -	Imagens dos isolados fúngicos obtidos das macroalgas marinhas e sua caracterização. Legenda: os números se referem aos códigos dos isolados, a=anverso; b=reverso	35
Figura 7 -	Halos de inibição ao redor dos plugs contendo as colônias fúngicas crescidas com 7 dias (a, b) e com 14 dias (c, d). Avaliação feita 24h após inoculação do microrganismo teste e incubação	41
Figura 8 -	Funil de separação contendo as frações orgânicas (superior) e aquosas (inferior) dos extratos 1 e 14, onde é possível observar a diferença de coloração entre as fases dos diferentes extratos	46
Figura 9 -	Frações orgânicas pós extração com acetato de etila evidenciando as diferenças nas cores obtidas	46
Figura 10 -	Extratos finalizados e suas diferenças de colorações e texturas. As figuras a-j correspondem aos extratos das amostras 1, 4, 6, 9, 11, 14, 15, 16, 17 e 19 respectivamente	47
Figura 11 -	Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à <i>E. coli</i>	49
Figura 12 -	IC50 dos extratos inibitórios em <i>E. coli</i> . Letras diferentes representam variâncias significativas segundo o post-hoc de Tukey	51
Figura 13 -	Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à <i>S. aureus</i>	52

Figura 14 -	Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à <i>E. faecalis</i>	54
Figura 15 -	Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à <i>V. cholerae</i>	55
Figura 16 -	IC50 dos extratos inibitórios em <i>V. cholerae</i> . Letras diferentes representam variâncias significativas segundo o post-hoc de Tukey	57
Figura 17 -	Gráfico dose-resposta dos 10 extratos frente à <i>C. albicans</i>	58
Figura 18 -	Características micromorfológicas de <i>Talaromyces sp.</i> Detalhes evidenciando sua estrutura reprodutora	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Origem dos isolados fúngicos holobiontes das macroalgas marinhas	34
Tabela 2 -	Halos de inibição em milímetros causados pelos isolados fúngicos 1 a 24 cultivados por 7 e por 14 dias contra os microrganismos padrões <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i>	42
Tabela 3 -	Halos de inibição em milímetros causados pelos isolados fúngicos 1 a 24 cultivados por 7 e por 14 dias contra os microrganismos padrões <i>V. cholerae</i> e <i>C. albicans</i>	43
Tabela 4 -	Halos de inibição em milímetros causados pelos isolados fúngicos 1 a 24 cultivados por 7 e por 14 dias contra os microrganismos padrões <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. enterica</i>	44
Tabela 5 -	Massa obtida dos extratos de cada isolado. Os números correspondem ao isolado a partir de onde foi originado o extrato	45
Tabela 6 -	Valores de CIM em µg/ml dos extratos testados frente aos microrganismos indicadores	48
Tabela 7 -	Valores de CBM em µg/ml dos extratos testados frente aos microrganismos indicadores	49
Tabela 8 -	Índices da regressão linear dos extratos em relação à <i>E. coli</i>	51
Tabela 9 -	Comparação dos índices inibitórios em µg/ml dos extratos significativos em <i>E. coli</i>	51
Tabela 10 -	Índices da regressão linear dos extratos em relação à <i>S. aureus</i>	53
Tabela 11 -	Índices da regressão linear dos extratos em relação à <i>E. faecalis</i>	55
Tabela 12 -	Índices da regressão linear dos extratos em relação à <i>V. cholerae</i>	57
Tabela 13 -	Comparação dos índices inibitórios em µg/ml dos extratos significativos em <i>V. cholerae</i>	57
Tabela 14 -	Índices da regressão linear dos extratos em relação à <i>C. albicans</i>	59
Tabela 15 -	Quantidade de microrganismos significativamente inibidos por cada extrato e suas origens	60
Tabela 16 -	Características morfológicas do micélio em cultivo (características macorscópicas) e dos conidióforos (características microscópicas)	61
Tabela 17 -	Espectros de massas dos extratos acetoetanólicos de isolados do gênero <i>Talaromyces</i> obtidos por análise de UPLC	64

Tabela 18 - Caracterização dos metabólitos presentes no extrato acetetanólico de isolados do gênero <i>Talaromyces</i> por análise de UPLC	64
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CYA	Czapek Yeast Autolysate Agar
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Electrospray ionization
FM	Fórmula Molecular
MEA	Malt Extract Agar
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
m/z	Razão massa/carga
TR	Tempo de Retenção
UPLC	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
μg	Micrograma
%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	A resistência antimicrobiana e a importância de se buscar novos compostos ...	16
2.2	Biofilme e os desafios de combatê-lo	18
2.3	Bioativos de fonte marinha	19
2.4	Macroalgas marinhas	20
2.5	Organismos holobiontes e metabólitos secundários de origem fúngica	21
2.6	O gênero Talaromyces	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	Coleta do material e identificação taxonômica das algas	26
4.2	Isolamento dos fungos epifíticos e endofíticos	27
4.3	Screening preliminar in vitro de atividade antimicrobiana e antifúngica dos isolados das algas (Agar plug test)	27
4.4	Produção dos extratos	28
4.5	Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos fúngicos (IC 50, CIM e CBM)	28
4.6	Identificação dos compostos predominantes nos extratos	30
4.7	Identificação morfológica dos isolados fúngicos promissores	30
4.8	Análise estatística	31
5	RESULTADOS	33
5.1	Coleta e identificação taxonômica das algas	33
5.2	Isolamento dos fungos	34
5.3	Screening preliminar (teste do ágar plug)	41
5.4	Produção dos extratos orgânicos	45
5.5	CIM, CBM e IC50 dos extratos orgânicos	48
5.6	Identificação morfológica dos fungos com inibição significativa	60
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	77

REFERÊNCIAS	78
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A cada ano, são registradas 700 mil mortes causadas por agentes infecciosos resistentes a antimicrobianos. Estima-se que até 2050, 10 milhões de vidas serão perdidas anualmente devido a complicações relacionadas a esse fenômeno. Classificada pela OMS como uma das 10 maiores ameaças mundiais de saúde pública (WHO, 2023), o fenômeno da resistência antimicrobiana se agrava em razão do uso indiscriminado de antibióticos e da alta disposição dessas drogas no ambiente (LAI *et al.*, 2022). Pelo menos 80% dos antibióticos administrados a humanos ou animais são excretados, via fezes e urina, inalterados quimicamente. Desta forma, ficam acumulados nos esgotos e sistemas de tratamento, solo e corpos hídricos, expondo o ambiente a níveis elevados de compostos antimicrobianos e outros fármacos (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019).

A pressão seletiva exercida pela exposição aos antimicrobianos ocasiona o aumento da frequência de microrganismos com genótipos/fenótipos resistentes, uma vez que esses organismos têm sua capacidade de sobrevivência aumentada no meio. Grande parte das bactérias possui outro agravante: a capacidade de se alojar em biofilmes bacterianos, o que lhes confere resistência e capacidade de sobrevivência ainda maiores. As estratégias para solucionar o problema da resistência a antimicrobianos devem ser multissetoriais, envolvendo programas sociais, políticas públicas, legislações e pesquisas científicas. No campo das pesquisas científicas, esforços são necessários para a identificação de novas moléculas antibióticas com baixa propensão para resistência, como drogas com alvos de “alto custo” para sobrevivência da célula, e com resposta farmacodinâmica rápida (ANDERSSON *et al.*, 2021).

A bioprospecção de moléculas com características físico-químicas únicas e com potencial para inibir infecções resistentes tem ganhado cada vez mais espaço na busca por alternativas eficientes aos antibióticos conhecidos. Alguns ambientes são considerados promissores para esta busca, como é o caso do ecossistema marinho.

Os organismos encontrados nos oceanos fornecem inúmeros compostos biologicamente ativos, em especial os microrganismos, que são fontes primárias de metabólitos secundários (DENG *et al.*, 2022). Fungos isolados a partir de organismos marinhos tem sido amplamente reportados como fonte de metabólitos diferenciados das mais variadas classes, como terpenos, terpenóides, policetídeos, alcalóides, flavonóides e outros (SATHIYASEELAN *et al.*, 2021).

Esses metabólitos com suas propriedades distintas podem ser utilizados na produção de fármacos, cosméticos, produtos agrícolas, veterinários, entre outros. Os bioativos

fúngicos pode ser obtidos a partir de extratos fúngicos. Nos últimos anos milhares de extratos fúngicos foram patenteados para uso em diferentes áreas (WIPO, 2024).

Desta forma, este estudo teve como objetivo fazer a bioprospecção a partir de fungos holobiontes de algas marinhas, a fim de se buscar bioativos capazes de inibir o crescimento bacteriano. Além disso, buscou-se identificar as espécies produtoras dos bioativos mais promissores, assim como a composição dos extratos bioativos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A resistência antimicrobiana e a importância de se buscar novos compostos

O primeiro composto antibiótico descoberto pela humanidade é um metabólito secundário de origem fúngica produzido pela espécie *Penicillium notatum*. Classificado como um β -lactâmico, a penicilina é um antibiótico de amplo espectro responsável por melhoras significativas nas práticas médicas e por influenciar fortemente o direcionamento das pesquisas farmacêuticas, o que permitiu que inúmeras vidas fossem salvas ao longo dos anos (SALYBEKOVA *et al.*, 2023).

Descoberta em 1928 pelo microbiologista Alexander Fleming (DEVI *et al.*, 2020), a penicilina abriu caminho para a pesquisa e desenvolvimento de outros antibióticos que, devido a seus benefícios farmacológicos e possibilidade de produção em massa, são largamente aplicados nos setores da saúde e na indústria agropecuária. O uso de antibióticos em larga escala ocasiona uma pressão seletiva que vem direcionando para o aumento do fenômeno da resistência antimicrobiana em todo o mundo (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

A resistência a antibióticos é um dos maiores desafios enfrentados pela medicina moderna em escala global. Para cada novo antibiótico produzido em massa, organismos resistentes aos seus princípios ativos são registrados em poucos anos: a produção e distribuição em massa da penicilina teve início em 1945, e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à droga emergiram nos anos 1950; a vancomicina, aprovada para uso médico em 1958, só começou a ser utilizada em ampla escala no início da década de 1980, e cepas de *Enterococcus* resistentes ao composto foram reportadas na França e nos EUA apenas seis anos depois (LAI *et al.*, 2022).

A resistência antimicrobiana é um processo evolucionário normal dos microrganismos, que é intensificada pelo uso exacerbado de antimicrobianos. Outros reagentes químicos como biocidas, metais pesados e fármacos não antibióticos exercem também uma pressão seletiva que direciona para a evolução de resistências (ANDERSSON *et al.*, 2021).

Os genes que conferem aos microrganismos a capacidade de sobreviver em um ambiente antes hostil, podem ser propagados para os descendentes (verticalmente), e ainda entre diferentes espécies (horizontalmente), aumentando sua frequência gênica na população (MCEWEN; COLLIGNON, 2018) e induzindo o surgimento das superbactérias. O sucesso na transmissão destes genes transferidos horizontalmente, é um dos fatores chave para a

disseminação das resistências, e é facilitada pela seleção decorrente da exposição ao antibiótico (SHANKAR, 2016).

Existem três mecanismos principais de resistência a antimicrobianos: 1) Inativação enzimática; 2) Redução da concentração celular (através da redução da permeabilidade pela redução do número de porinas; ou ainda através do mecanismo chamado *efflux pump*, que bombeia substâncias para fora da célula); 3) Modificação do alvo molecular (ribossomo, enzimas envolvidas na replicação). O mecanismo de resistência pode ser inato à bactéria ou adquirido, seja por transferência de genes, seja por mutações. Mutações pontuais ocorrem aleatoriamente no cromossomo bacteriano a uma frequência aproximada de 10^9 por gene, e se acumulam ao longo do tempo. Assim, a exposição aos antimicrobianos seleciona cepas que já possuíam ou desenvolveram o mecanismo de resistência em seu material genético (LAI *et al.*, 2022), favorecendo sua sobrevivência e dispersão.

O Instituto de Padrões Clínico e Laboratorial (*Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) estabelece padrões de medição de resistência antimicrobiana através de limites que caracterizam a resistência ou sensibilidade dos microrganismos. Os limites clínicos são medidos através da Concentração Inibitória Mínima (MIC) ou do diâmetro para classificar os organismos em ‘Susceptível’, ‘Susceptível Dependendo da Dose’, ‘Intermediário’, ‘Resistente’, ou ‘Não Susceptível’ (CLSI, 2021). Dentre os microrganismos definidos como prioridade 1 pela WHO (*World Health Organization - Organização mundial da Saúde*), devido a sua habilidade de causar internações, infecções mortais, facilidade de disseminação e opções de tratamento, destaca-se as bactérias Gram negativas, como *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemas (WHO, 2023).

Infecções causadas por organismos resistentes a antimicrobianos (AMR – *antimicrobial resistant*) são de difícil tratamento devido às limitações no uso de antibióticos, o que tem forçado profissionais de saúde a administrar altas dosagens e/ou fármacos com severos efeitos colaterais. O uso da colistina, por exemplo, apesar de estar associado ao risco de falência renal, é uma realidade no tratamento de infecções por bactérias Gram negativas resistentes nos casos em que a infecção possa representar risco de vida para o paciente (CHERNOV *et al.*, 2019).

Estima-se que, no ano de 2050, 10 milhões de mortes anuais serão atribuídas à incapacidade de tratamento de infecções em razão da resistência antimicrobiana. Estudos recentes sobre a situação de diversos países europeus e dos Estados Unidos não apontam melhoras em relação a esse problema, e sugerem que as estratégias para atenuá-lo devem lançar mão de uma abordagem multidisciplinar envolvendo programas, políticas, legislações e

pesquisas para combater a resistência antimicrobiana em humanos, animais e seus ambientes compartilhados (SHANKAR, 2016).

Buscar novos princípios ativos e/ou mecanismos de atuação se mostra uma estratégia promissora, visto que novas classes de antimicrobianos não são descobertas desde 1980. Os progressos registrados têm sido relacionados à modificação de classes de antimicrobianos já existentes, basicamente através da melhoria de parâmetros farmacocinéticos (CHERNOV *et al.*, 2019). Portanto, investigações para a descoberta de novas moléculas e a busca por novos alvos metabólicos de atuação se tornam gradativamente mais importantes a fim de evitar impactos sociais e nos sistemas de saúde.

2.2 Biofilme e os desafios de combatê-lo

O biofilme bacteriano é um agregado celular denso formado por microrganismos interligados em uma matriz polimérica extracelular. Dentro deste agregado, existe um consórcio bacteriano com células possuindo diferentes morfologias e fisiologias (ANDERSSON *et al.*, 2021).

As substâncias poliméricas extracelulares (SPE, ou em inglês *EPS*) do biofilme têm funções como: aumentar a estabilidade do biofilme, mediar adesões, transportar nutrientes e resíduos. É composto basicamente por exopolissacarídeos, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas produzidas pelos microrganismos durante o crescimento, reprodução e lise. Estas características fazem do biofilme um ambiente natural de proteção às células microbianas, sendo uma estrutura vantajosa na maioria dos ambientes e, por este motivo, adotada como uma forma universal de sobrevivência microbiana em pelo menos 90% das espécies (DENG *et al.*, 2022).

Os vários estágios de desenvolvimento do biofilme fazem deste um processo complexo e dinâmico. A adesão de células bacterianas planctônicas a uma interface, viva ou inanimada, inicia o processo. Após a adesão as células sofrem regulação gênica, modulando a secreção de EPS, de moléculas de sinalização e de comunicação celular (*quórum sensing*), além de modular o crescimento e reprodução. Ao atingir determinada densidade e arquitetura, fatores de transcrição são ativados regulando a produção de fatores de virulência e mais EPS. Isso leva à formação de microcolônias, a unidade básica da estrutura do biofilme, que crescem e se maturam em uma estrutura tridimensional, dotada de canais de água e poros para o transporte de nutrientes e resíduos. No estágio final, algumas células desprendem-se da superfície do biofilme para formar novos biofilmes (DENG *et al.*, 2022).

A natureza do biofilme faz com que essa estrutura seja altamente tolerante e persistente, fornecendo mecanismos complexos de resistência a antimicrobianos. A matriz do biofilme atua como uma barreira físico-química ao limitar a entrada de fármacos e outras substâncias. Além disso, a estrutura do biofilme também conta com enzimas degradadoras capazes de inativar moléculas bioativas, e com substâncias capazes de bloquear alvos moleculares, impedindo a ação de certos antibióticos. Patógenos bacterianos que vivem em biofilmes são 10 a 1000 vezes mais resistentes a tratamentos com antibióticos do que células de vida livre (ZAMMUTO *et al.*, 2022).

Neste contexto, entende-se o crescente interesse e a necessidade do uso de novas alternativas ao uso dos antibióticos e biocidas tradicionais. Alternativas podem ser buscadas no ambiente marinho, onde têm sido encontrados compostos naturais capazes de inibir a formação de biofilme bacteriano. Tal inibição pode acontecer de diferentes formas, entre elas: pela inativação dos sinais de *quorum sensing*, ou pela produção de enzimas degradadoras de polímeros, as quais interferem na formação e integridade do biofilme, reduzindo sua densidade e o crescimento bacteriano (ABDULRAHMAN *et al.*, 2022).

2.3 Bioativos de fonte marinha

O ambiente marinho cobre aproximadamente 70% do planeta Terra e possui alguns dos ecossistemas mais extremos conhecidos, o que resulta em sua baixa exploração em relação às suas dimensões. A adaptação celular necessária para sobrevivência nos ambientes extremos faz com que sejam desenvolvidas rotas bioquímicas de produção de compostos diferenciados. Apesar de ainda ter grandes áreas inexploradas, o ambiente marinho é considerado um reservatório de alta biodiversidade, e uma fonte de compostos químicos com características singulares. Quando comparados a produtos de fontes terrestres, os produtos naturais de origem marinha normalmente apresentam menor solubilidade, cadeias mais longas e anéis mais largos, com menos átomos de oxigênio e mais átomos de nitrogênio (PAPON; COPP; COURDAVAULT, 2022).

Os invertebrados marinhos são reconhecidos como um repositório natural de compostos com aplicações terapêuticas. Porém, muitos dos metabólitos responsáveis pela ação são na verdade produzidos por microrganismos que vivem em associação com o organismo hospedeiro. Tais associações têm se mostrado uma nova via de grande potencial para as pesquisas de bioprospecção. A natureza do ambiente marinho induz a síntese de diversos

metabólitos secundários bioativos pelos microrganismos que se associam a hospedeiros marinhos, numa tentativa de se adaptar às condições de sobrevivência (ABDULRAHMAN *et al.*, 2022).

Mais de 30.000 compostos bioativos de origem marinha já foram identificados e muitos já se encontram comercialmente disponíveis, a saber: proteínas, pigmentos, e vitaminas na indústria nutracêutica; aminoácidos, ácidos graxos e peptídeos na indústria farmacêutica; ágar, carragenana e antioxidantes na indústria alimentícia; colágeno, alginato e ácido hialurônico na indústria de cosméticos (GUPTA; MCKINNON; ABRAHAM, 2021).

Dentre os bioativos marinhos disponíveis no mercado, destacam-se aplicações no tratamento de câncer, malárias, infecções microbianas e até bioativos com potencial para o tratamento da COVID-19, como é o caso da holicondrina B, isolado da esponja marinha *Halichondria okadai* (ATTIQ *et al.*, 2022). Atualmente, pelo menos 33 compostos de origem marinha se encontram em testes clínicos em diferentes fases. Do ponto de vista econômico, estima-se que a exploração de fármacos derivados de produtos naturais marinhos ultrapassará 10 bilhões de dólares até 2026 (PAPON; COPP; COURDAVAULT, 2022).

A obtenção de metabólitos de interesse pode acontecer por métodos de extração e purificação química usando o próprio organismo como fonte, ou a partir da expressão heteróloga. Uma vez conhecida a biologia do organismo fonte do bioativo, as técnicas de engenharia metabólica permitem fazer a exploração e expressão heteróloga do composto em fábricas celulares microbianas, evitando a superexploração da fonte natural e preservando a espécie provedora do composto (SEPULVEDA *et al.*, 2021).

A produção microbiológica de bioativos em biorreatores tem se mostrado eficiente para o desenvolvimento de vários fármacos em larga escala: antibacterianos (como eritromicina, e penicilina); antifúngicos (como anfotericina B); antiparasitários (como: avermectinas); e imunossupressores (como ciclosporinas) (KELLER, 2019).

2.4 Macroalgas marinhas

As macroalgas marinhas são organismos eucariontes fotossintéticos que podem ser subdivididos em três grupos: algas vermelhas, algas pardas e algas verdes (DAVID BAHARULNIZAM; RAJABALAYA 2022). Esses organismos são fontes de componentes importantes para a saúde humana: aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas, polifenóis, e minerais (DEMARCO *et al.*, 2022).

As algas vermelhas contêm bioativos antioxidantes potentes, anti-inflamatórios, fotoprotetivos e antimelanogênicos, o que contribui para sua capacidade de prosperar nos mais diversos ambientes, respondendo às mudanças com uma produção de vários metabólitos secundários como fluorotanino, polissacarídeos sulfatados, carotenoides, flavonoides, e polifenóis (DAVID; BAHARULNIZAM; RAJABALAYA, 2022). Algas marrons têm mostrado potencial na produção de alginato e fucoïdan. As algas verdes, por sua vez, são usualmente exploradas para a obtenção de carragenana, amido e pigmentos. Devido à gama de compostos importantes que podem ser encontrados nas macroalgas, esses organismos têm sido amplamente explorados para a produção de diversos produtos como biocombustíveis, produtos farmacêuticos e nutracêuticos (GUPTA; MCKINNON; ABRAHAM, 2021).

A obtenção dos metabólitos secundários é comumente feita através da extração por meio de solventes orgânicos. Sabe-se que a polaridade do solvente influencia a extração de compostos específicos. Dentre os solventes possíveis, o acetato de etila é caracterizado por ter uma polaridade mediana e baixa toxicidade, sendo adequado para extração de compostos bioativos polares ou apolares (ABDULRAHMAN *et al.*, 2022). Um número considerável de estudos reporta resultados satisfatórios na extração de bioativos com atividades antibióticas utilizando o acetato de etila (DAVID; BAHARULNIZAM; RAJABALAYA, 2022; EL-BONDKLY; EL-BONDKLY; EL-BONDKLY, 2021; JAYATILAKE; MUNASINGHE, 2020; KAMAT *et al.*, 2020; M *et al.*, 2021). Kumar; Prasher (2022) reportam que os resultados do seu trabalho claramente apontam o acetato de etila como tendo um resultado mais satisfatório quanto a produção de extratos antibacterianos.

Dentre os componentes presentes nas macroalgas, os pigmentos se destacam por seu potencial bioativo e pela diversidade de aplicações. Estes pigmentos de coloração natural podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e nutracêutica. As principais classes de pigmentos fotossintéticos encontrados nas algas são as clorofilas, carotenóides e ficobilinas (DEMARCO *et al.*, 2022).

Além de todas as suas propriedades, macroalgas marinhas têm sido estabelecidas como uma fonte de fungos (endofíticos e epifíticos) capazes de produzir substâncias com características distintas e de alto potencial biotecnológico. Por serem filogeneticamente mais diversos que outros microrganismos, o potencial dos fungos como fonte de bioativo tem ganhado destaque para bioprospecção (GIDDINGS, 2022).

2.5 Organismos holobiontes e metabólitos secundários de origem fúngica

Organismos holobiontes são entidades compostas por comunidades microbianas que habitam um organismo hospedeiro. Este microbioma dentro e ao redor do organismo anfitrião influencia e é influenciado quanto à produção de metabólitos secundários (SCHNEIDER, 2021).

Microrganismos fúngicos são reconhecidos como fonte de uma miríade de metabólitos secundários biologicamente ativos (SHAKOUR; FARAG, 2022). Metabólitos secundários são compostos orgânicos derivados de vias metabólicas centrais, podendo atuar na proteção contra diversas ameaças, como espécies reativas de oxigênio, radiação ultravioleta (pigmentos como a melanina são frequentemente produzidos em clusters de genes biossintéticos), proteção contra moléculas de origem patogênica (produção de transportadores de toxinas e enzimas detoxificantes), entre outras ações. A maioria dos produtos naturais de importância farmacológica é derivada do metabolismo secundário dos organismos (KELLER, 2019).

Diferentemente dos metabólitos primários, os secundários não estão envolvidos diretamente no crescimento, desenvolvimento, reprodução e geração de energia, mas em atividades biológicas que contribuem para a sobrevivência do organismo no nicho que ocupa. Devido a essas características, os metabólitos secundários são considerados promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (DEVI *et al.*, 2020).

Apesar de metabólitos de origem vegetal serem extensivamente explorados no mercado internacional, os fungos representam uma fonte de metabólitos de classes e características únicas, com potencial para combater cânceres e infecções multirresistentes (SHAKOUR; FARAG, 2022). Vários destes metabólitos, já conhecidos e caracterizados, têm ações potentes e de grande importância para a saúde humana, como penicilinas, estatinas, ciclosporinas e ácido micofenólico (PAPON; COPP; COURDAVAULT, 2022).

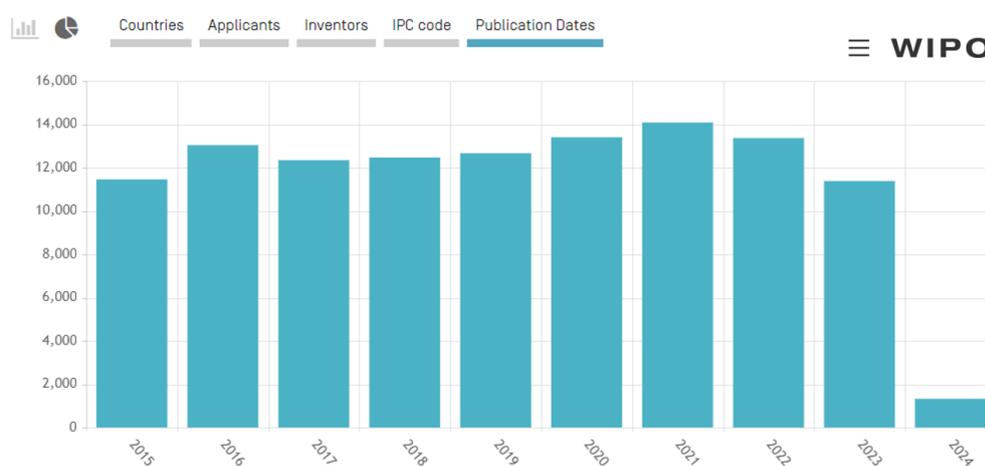
Os metabólitos secundários fúngicos podem ser divididos em quatro classes químicas principais: terpenóides, policetídeos, peptídeos não ribossomais, e compostos derivados de ácidos chiquímicos. Existem ainda os metabólitos híbridos, que consistem em associações de várias classes, tais como monoterpenóides que são a fusão de policetídeos e terpenos. Dentre os táxons fúngicos, os Ascomycetos apresentam a maior quantidade de genes relacionados ao metabolismo secundário, sendo importantes alvos de investigação (DEVI *et al.*, 2020).

Já existem diversos registros de bioativos isolados de fungos marinhos, como: ciclohexapeptídeos e policetídeos com atividade anticâncer; cladomarina, com atividade antimicrobiana; e a plinabulina, que se encontra em fase de testes clínicos avançados (fase III)

em pacientes com câncer de pulmão, tendo inclusive aumentado a taxa de sobrevivência desses pacientes (GIDDINGS, 2022). Atualmente, a análise dos metabólitos produzidos por um organismo pode ser realizada através de técnicas avançadas em metabolômica. Um inventário de metabolomas e a descoberta de novos compostos podem ser atingidos utilizando ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas acoplada a cromatografia. Tais métodos vêm sendo largamente utilizados na elucidação de vias biossintéticas secundárias. Avanços de conhecimento na área das ômicas (metabolômica, genômica, proteômica) possibilitam melhores compreensões da regulação dessas vias metabólicas secundárias (SHAKOUR; FARAG, 2022).

Nos últimos anos, milhares de extratos fúngicos foram registrados na plataforma internacional de registro de patentes WIPO (World Intellectual Property Organization), mostrando a diversidade de atuações dos bioativos fúngicos. Na figura 1, é possível ver o registro dos últimos 10 anos de deposição de patentes com extratos bioativos de origem fúngica (WIPO, 2024).

Figura 1 - Registro de quantidade de patentes relacionadas a extratos fúngicos nos últimos 10 anos na plataforma internacional WIPO



Fonte: WIPO, 2024

2.6 O gênero *Talaromyces*

O gênero *Talaromyces*, (Eurotiomycetes, Trichocomaceae), foi inicialmente criado para agrupar os teleomorfos biverticilados da espécie *Penicillium*. Entretanto, de acordo com o princípio “um fungo – um nome” da taxonomia fúngica, que adota a uma denominação holomórfica única para espécies que apresentam dois estágios diferentes de ciclo de vida,

Talaromyces sp. agora inclui todas as espécies do subgênero *Biverticillium* de *Penicillium*, enquanto *Penicillium sp.* agrupa as espécies do subgênero *Aspergilloides*, *Furcatum*, e *Penicillium*, seu associados teleomorfos *Eupenicillium*, e espécies classificadas em alguns gêneros relacionados (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Espécies do gênero *Talaromyces*, que pertencem ao filo *Ascomycota* do reino *Fungi*, tem sido reportadas como agentes degradadores de celulose e outros resíduos, fonte renovável de corantes naturais, estimulador da fitorremediação, efeito inseticida, efeito antiviral, efeito antibacteriano, e estimulador do crescimento vegetal. Todas essas atividades fazem com que produtos desse gênero tenham potencial para aplicação como novos fungicidas, bactericidas, pesticidas, biofertilizantes, e biocombustíveis (ADELUSI *et al.*, 2022).

Espécies do gênero *Talaromyces* são amplamente distribuídas nos solos, plantas, esponjas, e alimentos. Estudos recentes demonstram que essas espécies são muito abundantes nos ambientes marinhos. Devido as condições extremas a que os microrganismos são submetidos nos oceanos, este ambiente induz o desenvolvimento de padrões metabólicos específicos o que contribui para a riqueza de substâncias estruturalmente diversa e ativa (CAI *et al.*, 2020; LAI *et al.*, 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Realizar a bioprospecção de compostos bioativos extracelulares com atividade antimicrobiana a partir de fungos isolados de macroalgas marinhas.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a capacidade de fungos isolados de macroalgas marinhas para produzir bioativos extracelulares com atividade antibiótica e antifúngica;
- Identificar os compostos bioativos produzidos pelos fungos isolados de macroalgas marinhas;
- Caracterizar as atividades biológicas exercidas pelos bioativos
- Comparar as características já documentadas dos bioativos identificados com as atividades verificadas neste trabalho.
- Identificar os isolados fúngicos produtores de bioativos promissores.

4 METODOLOGIA

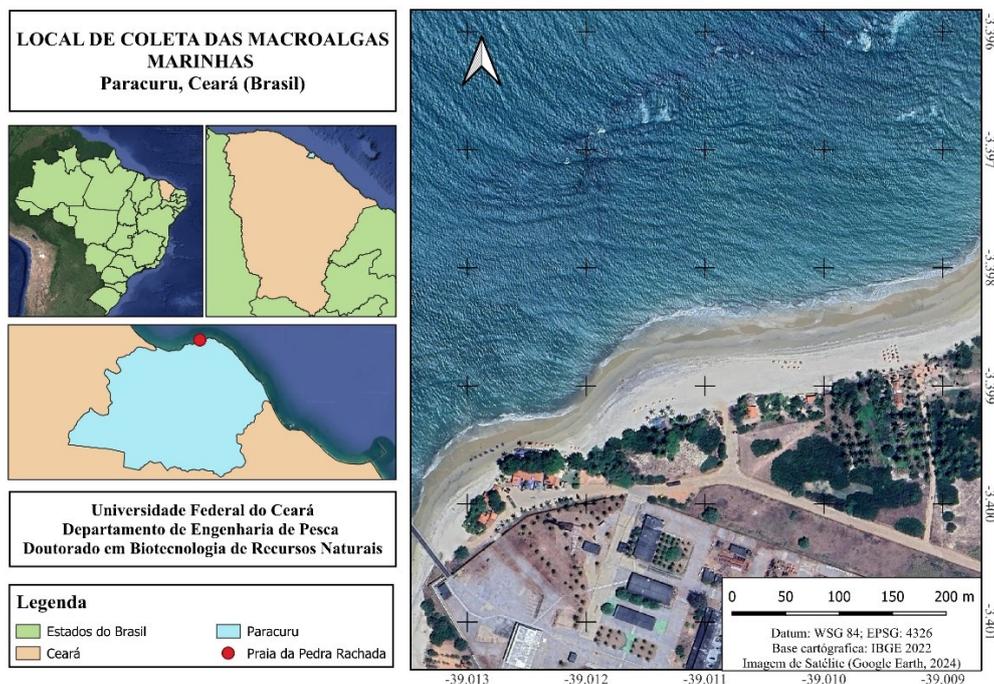
4.1 Coleta do material e identificação taxonômica das algas

Diferentes espécies de macroalgas marinhas foram coletadas na praia da Pedra Rachada, em Paracuru, no estado do Ceará (-3.3990900, -39.0115885) (Figura 2). A região foi escolhida devido ao conhecimento de seu alto potencial de diversidade algal, já exploradas pela comunidade local e pela academia. O acesso ao patrimônio genético foi cadastrado no SisGen sob o número: AF56AC8.

As algas coletadas foram lavadas com água do mar, colocadas em sacos plásticos e transportadas em caixas térmicas (HARIKRISHNAN *et al.*, 2021) até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado da Universidade Federal do Ceará (LAMAP/UFC), onde foram processadas.

A identificação das espécies algais foi realizada usando chaves dicotômicas no Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, e conforme instruções do livro *Macroalgas Marinhas do Brasil* (NASSAR, 2012).

Figura 2 – Identificação do local onde foi realizada a coleta das macroalgas marinhas.



Fonte: AUTORA, 2024

4.2 Isolamento dos fungos epifíticos e endofíticos

No laboratório, as algas foram lavadas utilizando água destilada estéril, visando à remoção de detritos e resíduos. Uma parte das algas foi colocada em placas de Petri contendo ágar batata para isolamento dos fungos epifíticos, e outra parte teve sua superfície desinfetada para isolamento de fungos endofíticos.

A desinfecção da superfície consistiu de imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 3,5% por 5 minutos. O material foi lavado novamente com etanol 70% por 30 segundos, e em seguida, com água destilada por 1 minuto (ABDALLA *et al.*, 2020). As algas foram cortadas em finas camadas (aproximadamente 2x2 mm) com um bisturi estéril, e então inoculadas em ágar batata (PDA – *Potato Dextrose Agar*), suplementado com cloranfenicol 200 mg/L, de modo que os cortes ficassem em contato com o meio. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Colônias fúngicas crescidas a partir dos fragmentos foram isoladas em novas placas contendo ágar batata (HARIKRISHNAN *et al.*, 2021).

Para garantir a segurança e origem endofítica dos fungos cultivados, a água utilizada na última lavagem da desinfecção das superfícies das algas foi inoculada em placa contendo meio ágar batata (PDA), e incubada por 7 dias a 28°C ±2°C (KAMAT *et al.*, 2020).

4.3 *Screening* preliminar *in vitro* de atividade antimicrobiana e antifúngica dos isolados das algas (*Agar plug test*).

Os isolados fúngicos foram submetidos ao ensaio de difusão de plug (*Agar plug test*) contra patógenos microbianos e fúngico. Cada isolado foi testado na forma de culturas puras crescidas em ágar batata por sete e por catorze dias contra sete patógenos teste, pertencentes ao acervo da coleção microbiológica Regine Vieira: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* L18, *Vibrio cholerae* ATCC 19582, e *Candida albicans* INCQS 40178.

Os patógenos foram ajustados de acordo com a escala 0,5 de MacFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, e inoculados em meio ágar Mueller Hinton com o auxílio de um *swab* estéril (CLSI, 2021).

Os *plugs* de 5mm contendo as culturas fúngicas crescidas foram obtidos com o auxílio de um cortador estéril, sendo em seguida transferidos para as placas contendo o meio já inoculado com os microrganismos patogênicos teste.

O experimento foi feito em triplicata, e as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação o diâmetro das zonas de inibição foram medidos. As cepas com maior potencial inibitório foram selecionadas para investigação e identificação de suas atividades (JAYATILAKE; MUNASINGHE, 2020).

4.4 Produção dos extratos

As cepas com melhor atividade antimicrobiana e antifúngica foram crescidas em 150 mL de caldo batata de forma estática por 14 dias a 28°C para produção dos compostos bioativos (MOHAMED *et al.*, 2021). Após incubação, a cultura foi filtrada em uma camada dupla de papel filtro para remoção do micélio fúngico. O material filtrado foi centrifugado a 6000 rpm em temperatura ambiente por 15 minutos.

O filtrado livre de células foi submetido a extrações com acetato de etila pela adição de 150 mL deste reagente ao caldo fermentado, para a extração líquido-líquido. O material foi mantido sob agitação por 30 min e em seguida ficou em repouso por mais 30 min. Em um funil de separação, a fração do acetato de etila (fase orgânica) foi coletada. O procedimento foi repetido mais duas vezes, e as três frações foram misturadas e concentradas em rotaevaporador angular a 100 rpm e 37°C (JAYATILAKE; MUNASINGHE, 2020).

Após concentração e obtenção do material sólido, as amostras foram pesadas e diluídas com o auxílio de 2% de DMSO (Dimetilsulfóxido) na solução final.

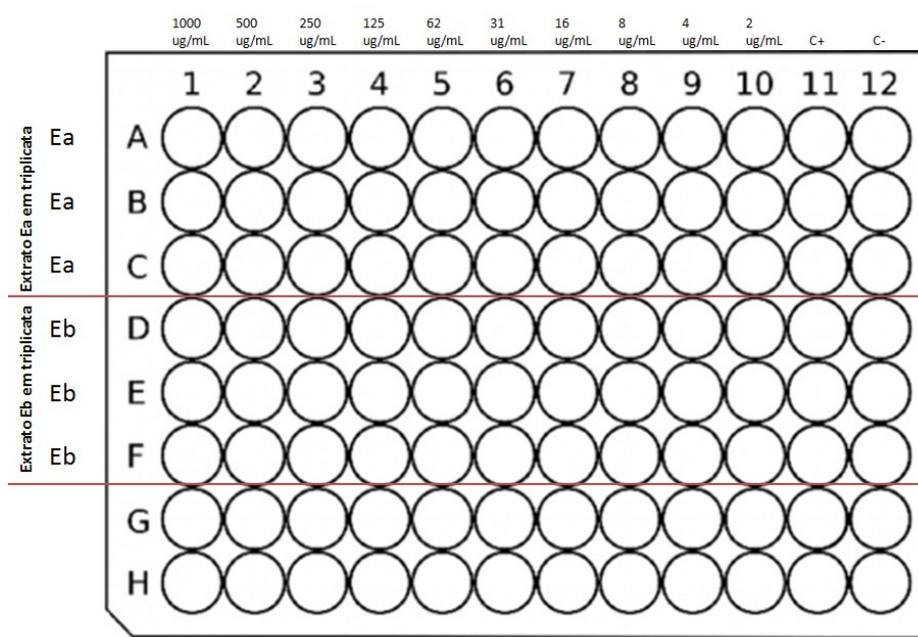
4.5 Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos fúngicos (IC 50, CIM e CBM).

O potencial de inibição dos extratos foi avaliado a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), e concentração inibitória média (IC50).

Para definição dos índices de inibição foi feito o método de microdiluição em placa de 96 poços de acordo com o documento M07-A7 de Padrões de teste de Susceptibilidade Antimicrobiana do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2021). O material foi serialmente diluído, sendo assim testadas as concentrações do extrato de 1000 µg/mL, 500

$\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,2 $\mu\text{g/mL}$, 15,6 $\mu\text{g/mL}$, 7,8 $\mu\text{g/mL}$, 3,9 $\mu\text{g/mL}$, até 1,9 $\mu\text{g/mL}$, todas em triplicata, como exibido na figura 3:

Figura 3 - Esquematização dos componentes presentes na placa de 96 poços para o teste de microdiluição em caldo. Estão representados na figura as concentrações testadas, onde cada amostra se localiza na placa, a representação de duas amostras, e onde foi adicionado os controles positivo e negativo.



Legenda: C+ = controle positivo; C- = controle negativo; Ea = Extrato a; Eb = extrato b (arbitrários)

Fonte: AUTORA, 2024

Os poços foram preenchidos com 150 μL contendo: caldo Muller Hinton duplo, microrganismos teste ajustado a 5×10^5 UFC/mL e os extratos orgânicos serialmente diluídos. O controle negativo foi o antibiótico de amplo espectro ampicilina 5 $\mu\text{g/mL}$ para as bactérias, e fluconazol 16 $\mu\text{g/mL}$ para a levedura, e o controle positivo consistiu de caldo duplo e o microrganismo teste. Nos dois controles foi adicionado 2% de DMSO.

Após 24h de incubação, as placas foram observadas com auxílio de uma lupa e com iluminação sob a placa. A ausência de turvação na menor concentração foi considerada a CIM. A partir da identificação da CIM, foi feito o subcultivo em ágar Muller Hinton das concentrações que não mostraram crescimento bacteriano. A CBM foi a menor concentração desse subcultivo que matou 99,9% do inóculo (JAYATILAKE; MUNASINGHE, 2020;TECHAOEI *et al.*, 2020).

A IC50 foi definida a partir da equação da curva dose-resposta após leitura no leitor de microplacas a um comprimento de onda de 600nm. A absorbância dos poços após a leitura foi convertida em % de inibição celular de acordo com a seguinte equação (HARIKRISHNAN *et al.*, 2021):

$$\text{Inibição celular} = \left(\frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \right) \times 100\% \quad (\text{Eq. 01})$$

4.6 Identificação dos compostos predominantes nos extratos

Os extratos com melhores desempenhos na inibição microbiana foram submetidos a análise por cromatográfica através de um sistema UPLC® Waters Acquity acoplado a detectores de massas do tipo quadrupolo e de arranjo de diodos (UPLC-Q-Da, Waters, Milford, MA, EUA). Inicialmente, as amostras foram previamente filtradas através de membranas de PTFE de 0,22 µm (Millipore®) com as análises cromatográficas realizadas em uma coluna BEH C18 (150 mm x 2,1 mm, 1,7 micrometros) a 40°C e volume de injeção de 5 µL. A fase móvel foi composta por 0,1% de água deionizada (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. Os extratos foram submetidos ao seguinte gradiente exploratório: 2-100% B (22 min), 100% B (22,1-25 min), 2% B (26-30 min), com um fluxo de 0,3 mL/min. A ionização foi executada utilizando electrospray (ESI) em modo positivo e negativo. Os seguintes parâmetros foram utilizados: tensão capilar de 0,8 kV, tensão do cone de extração de 15 V, fonte de temperatura 120°C, temperatura de dessolvatação a 350°C, dessolvatação de gás a 500 L/h. O sistema foi controlado utilizando o software Empower 3 (Waters Corporation). (SANTOS *et al.*, 2020)

A identificação dos compostos foi realizada baseada na razão massa carga (m/z) de cada composto, nos padrões de fragmentação dos espectros, nos cromatogramas obtidos e na literatura a partir dos compostos descritos produzidos pelas espécies fúngicas identificadas neste trabalho com potencial inibitório avaliado.

4.7 Identificação morfológica dos isolados fúngicos promissores

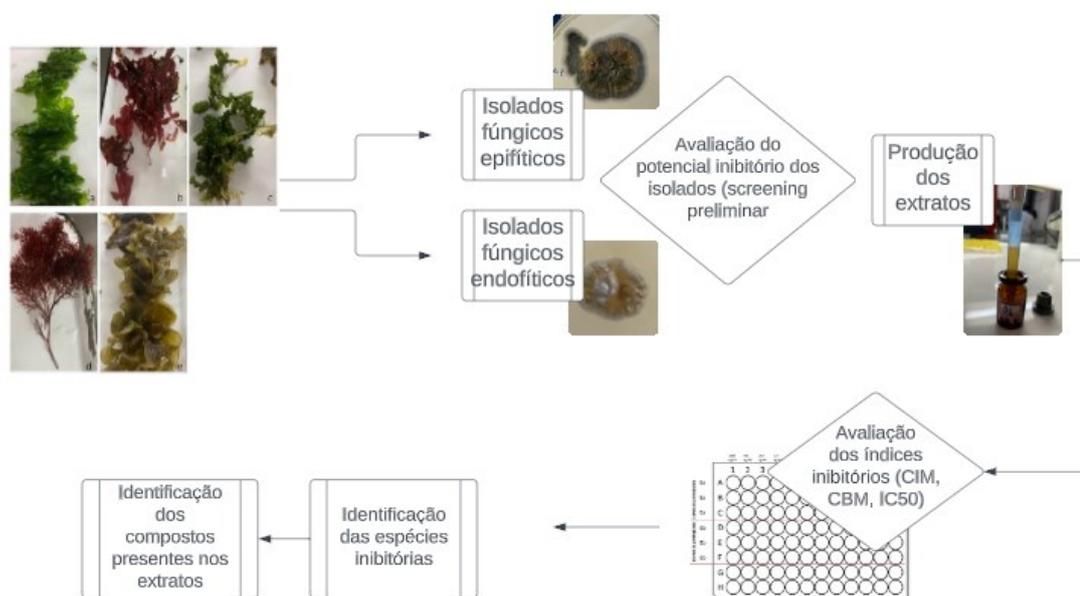
A identificação morfológica dos isolados fúngicos foi feita a partir do crescimento micelial em placas de Petri contendo ágar batata. Foi avaliada as características da superfície

da colônia, como textura, cor, bordas da colônia, diâmetro e padrão de crescimento. A análise foi feita entre 7 e 14 dias de crescimento de cada isolado.

Além das características macroscópicas da colônia, foram também avaliadas as características microscópicas. Porções da região em crescimento micelial foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e coradas com o reagente fenólico azul de algodão, a lâmina foi coberta com uma lamínula e examinada em microscópio ótico utilizando as lentes objetivas de 40x e 100x. Os isolados foram caracterizados e identificados utilizando guias taxonômicos (FIGUERAS *et al.*, 2014). Os isolados puros foram mantidos em armazenamento em tubos com rampas de ágar batata e estão armazenados junto a coleção microbiológica Regine Vieira de Sousa no LAMAP.

O fluxograma da figura 4 ilustra e resume a metodologia apresentada:

Figura 4 - Fluxograma de resumo dos processos metodológicos aplicados.



Fonte: AUTORA, 2024

4.8 Análise estatística

Todos os dados foram avaliados em triplicata utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. O desvio padrão e a variância, foram calculados e plotados em gráficos e tabelas. As diferenças de inibição em relação aos isolados cultivados por 7 e por 14 dias foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. A avaliação da IC50 foi calculada a partir da curva de regressão

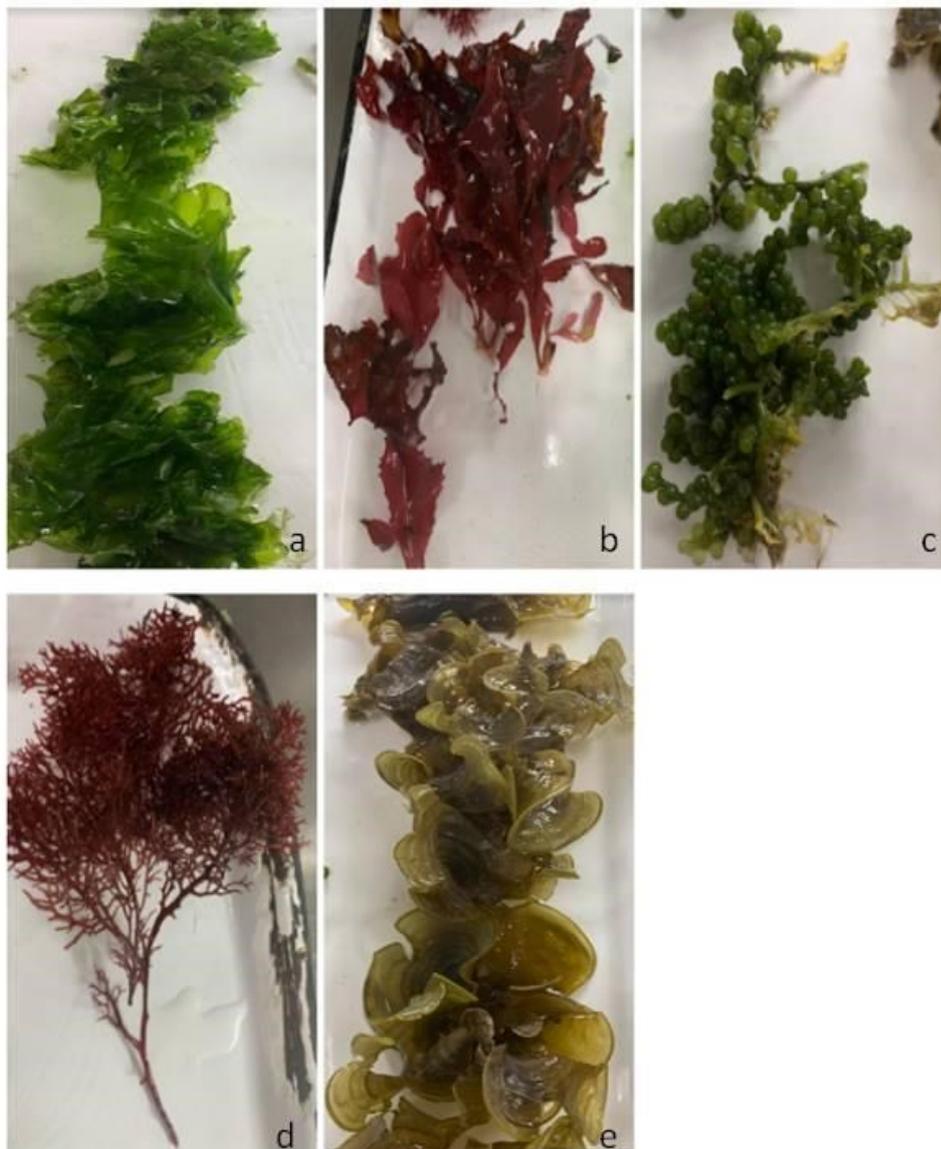
não linear de cada um dos extratos contra os isolados teste, e suas diferenças foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey com nível de significância 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Coleta e identificação taxonômica das algas

Foram coletadas 5 espécies de macroalgas, incluindo representantes dos principais filos, sendo: duas algas vermelhas (Rhodophyta); duas algas verdes (Chlorophyta); e uma alga marrom (Phaeophyceae). As espécies foram identificadas como: *Ulva fasciata* (a), *Cryptonemia crenulata* (b), *Caulerpa racemosa* (c), *Gracilaria ferox* (d), *Padina gymnospora* (e). Na Figura 5 é possível visualizar a morfologia das algas coletadas.

Figura 5 - Imagens a-e das algas identificadas respectivamente como: *Ulva fasciata* (a), *Cryptonemia crenulata* (b), *Caulerpa racemosa* (c), *Gracilaria ferox* (d), *Padina gymnospora* (e)



Fonte: AUTORA, 2024

5.2 Isolamento dos fungos

Um total de 24 cepas fúngicas, sendo oito endofíticas e dezesseis epifíticas, foram isoladas a partir das cinco espécies de macroalgas coletadas. A tabela 1 mostra a origem de cada um dos isolados.

Tabela 1 - Origem dos isolados fúngicos holobiontes das macroalgas marinhas

Espécie algal	Isolados	Origem anatômica
<i>Caulerpa racemosa</i>	1	Epifítico
	2	Epifítico
	3	Epifítico
	4	Epifítico
	5	Epifítico
	6	Endofítico
	7	Endofítico
<i>Ulva fasciata</i>	8	Epifítico
	9	Epifítico
<i>Gracilaria ferox</i>	10	Epifítico
	11	Epifítico
	12	Epifítico
<i>Criptonemia crenulata</i>	13	Endofítico
	14	Endofítico
	15	Endofítico
<i>Padina gymnospora</i>	16	Epifítico
	17	Epifítico
	18	Epifítico
	19	Epifítico
	20	Epifítico
	21	Endofítico
	22	Endofítico
	23	Endofítico
<i>Criptonemia crenulata</i>	24	Epifítico

Fonte: AUTORA, 2024

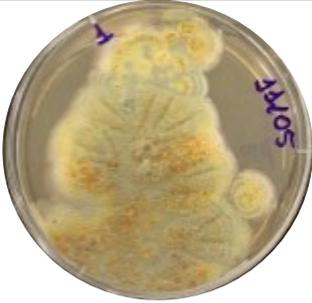
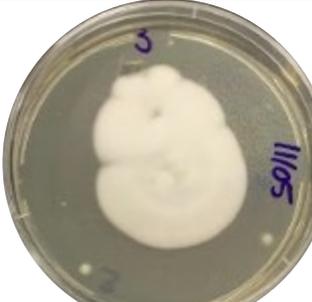
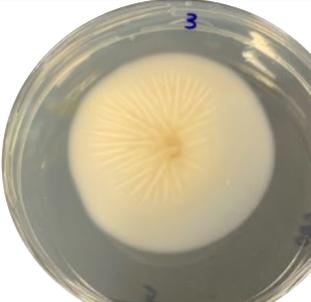
A partir das espécies *C. racemosa*, *C. crenulata*, e *P. gymnospora* foi possível isolar tanto fungos epifíticos como endofíticos. Ou seja, não foi percebido uma preferência pelo local

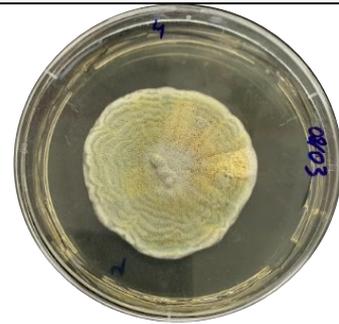
de crescimento do fungo no organismo em relação ao filo pertencente da alga, já que foi encontrado os dois tipos em todos os filós. Já nas espécie *U. fasciata* e *G. ferox* foram isolados apenas fungos epifíticos.

A figura 6 (imagens 1 a 24) ilustra os fungos isolados:

Figura 6 - Imagens dos isolados fúngicos obtidos das macroalgas marinhas e sua caracterização.

Legenda: os números se referem aos códigos dos isolados, a=anverso; b=reverso

Anverso	Reverso	Caracterização
		Micélio: filamentoso Cor: verde Textura: pulverulento Exsudato: amarelo oleoso Reverso: castanho claro
		Micélio: filamentoso Cor: verde Textura: pulverulento Exsudato: amarelo oleoso Reverso: castanho claro
		Micélio: filamentoso Cor: branco Textura: glabroso Exsudato: ausente Reverso: branco



4a



4b

Micélio: filamentoso

Cor: verde

Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho claro



5a



5b

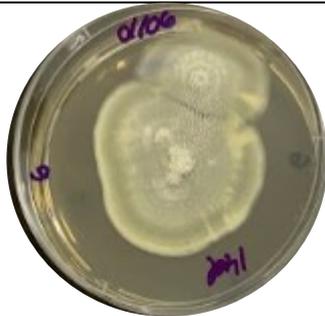
Micélio: filamentoso

Cor: verde escuro

Textura: granuloso

Exsudato: ausente

Reverso: bege com áreas rosadas nas extremidades



6a



6b

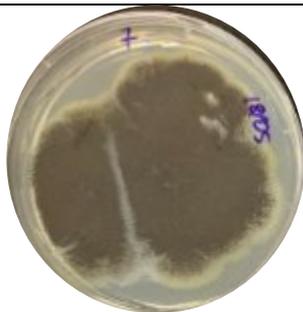
Micélio: filamentoso

Cor: verde

Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho claro



7a



7b

Micélio: filamentoso

Cor: preto

Textura: arenoso

Exsudato: ausente

Reverso: cinza opaco



8a



8b

Micélio: filamentoso

Cor: bege

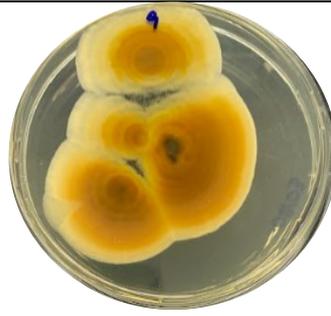
Textura: cuneiforme rígido

Exsudato: ausente

Reverso: bege



9a



9b

Micélio: filamentoso

Cor: verde

Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho claro



10a



10b

Micélio: filamentoso

Cor: verde

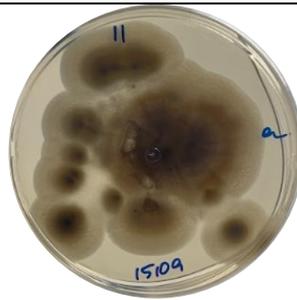
Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho claro



11a



11b

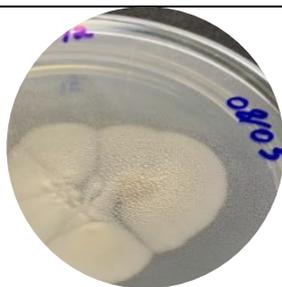
Micélio: filamentoso

Cor: verde

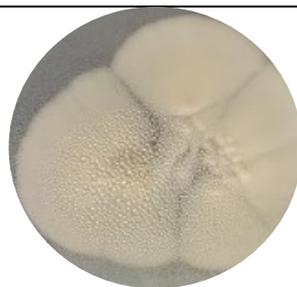
Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho escuro



12a



12b

Micélio: filamentoso

Cor: branco

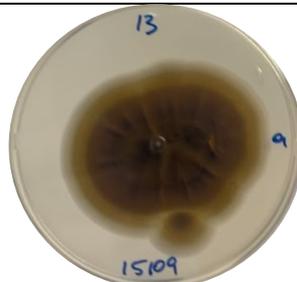
Textura: glabroso

Exsudato: ausente

Reverso: branco



13a



13b

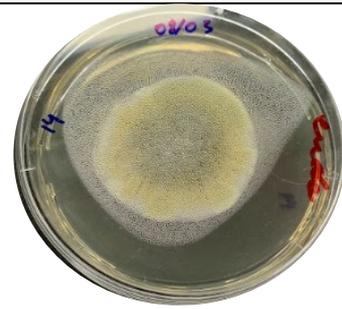
Micélio: filamentoso

Cor: verde

Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho escuro



14a



14b

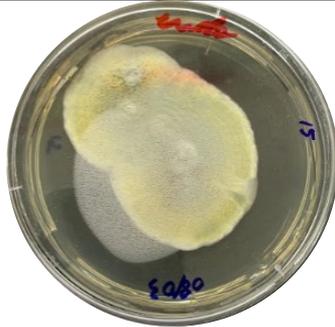
Micélio: filamentoso

Cor: verde

Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho claro



15a



15b

Micélio: filamentoso

Cor: verde

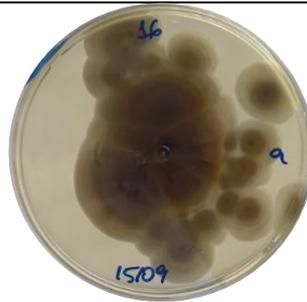
Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho claro



16a



16b

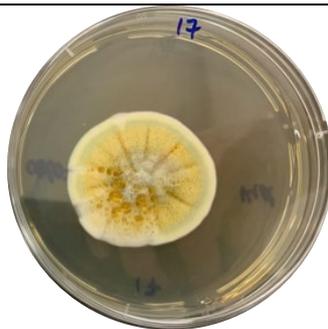
Micélio: filamentoso

Cor: verde

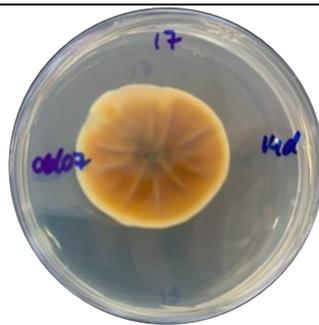
Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho escuro



17a



17b

Micélio: filamentoso

Cor: verde

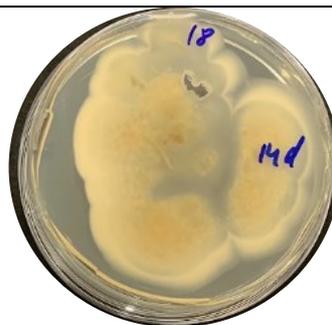
Textura: pulverulento

Exsudato: amarelo oleoso

Reverso: castanho claro



18a



18b

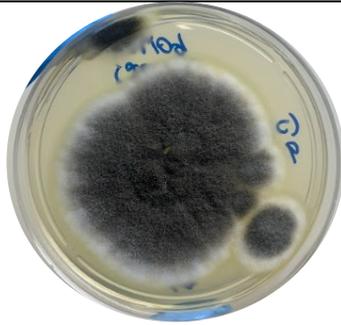
Micélio: filamentoso

Cor: branco

Textura: aveludado

Exsudato: ausente

Reverso: bege



19a



19b

Micélio: filamentoso
 Cor: cinza, bordas brancas
 Textura: algodonooso
 Exsudato: ausente
 Reverso: verde



20a



20b

Micélio: filamentoso
 Cor: cinza
 Textura: algodonoosa
 Exsudato: ausente
 Reverso: cinza



21a



21b

Micélio: filamentoso
 Cor: cinza
 Textura: algodonoosa
 Exsudato: ausente
 Reverso: cinza

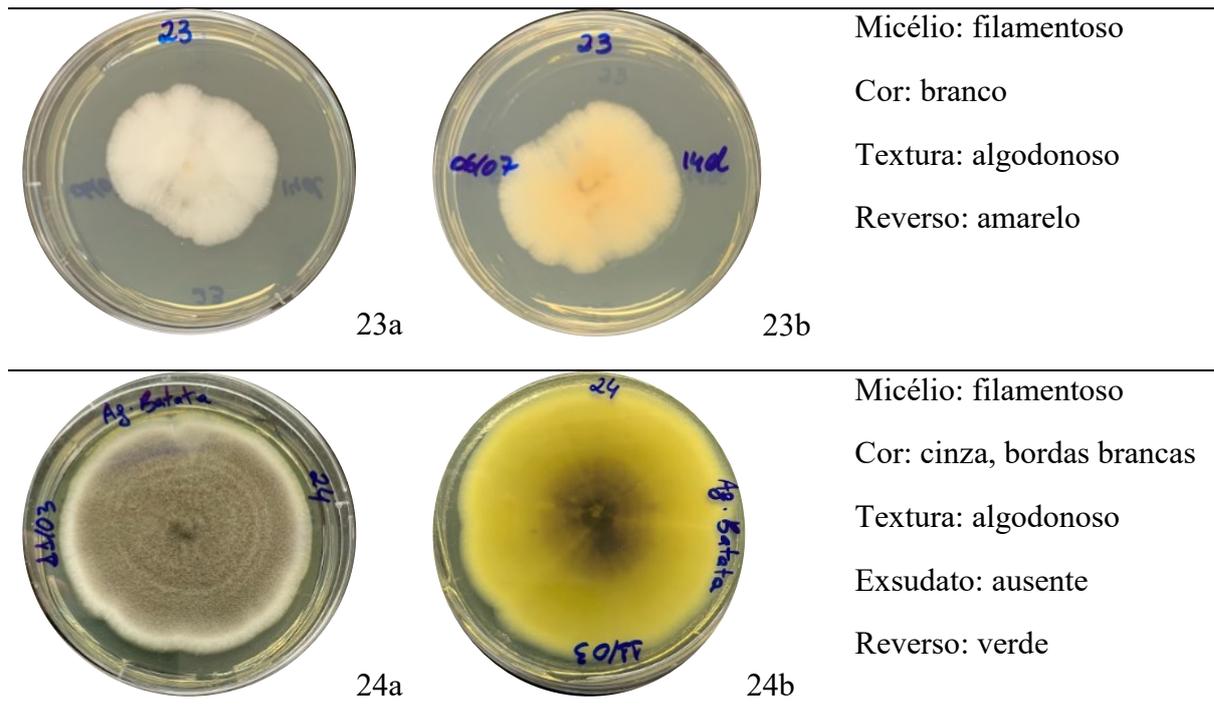


22a



22b

Micélio: filamentoso
 Cor: branco
 Textura: algodonooso
 Exsudato: ausente
 Reverso: branco



Fonte: AUTORA, 2024

A partir dos 24 fungos isolados, foi possível identificar pelo menos 10 grupos de indivíduos semelhantes entre si, o grupo 1 formado pelos isolados “1, 2, 4, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 e 17”, com características de um micélio filamentosos verde, pulverulento, com presença de exsudato amarelo e oleoso, e reverso castanho claro ou escuro; o grupo 2 formado pelos isolados “3 e 12”, com micélio filamentosos branco, glabroso, e reverso branco; o grupo 3 formado pelo isolado “5” com micélio filamentosos verde escuro, granuloso, borda branca e reverso bege com áreas rosadas nas extremidades; o grupo 4 formado pelo isolado “7” com micélio filamentosos preto arenoso e reverso cinza opaco; o grupo 5 formado pelo isolado “8” com micélio filamentosos cuneiforme, rígido bege, e reverso bege; o grupo 6 formado pelo isolado “18” com micélio filamentosos branco aveludado, e reverso bege; o grupo 7 formado pelos isolados “19 e 24” com micélio filamentosos algodono cinza e bordas brancas, e reverso verde; o grupo 8 formado pelos isolados “20 e 21” com micélio filamentosos aéreo cinza, algodono, e reverso cinza; o grupo 9 formado pelo isolado “22” com micélio filamentosos

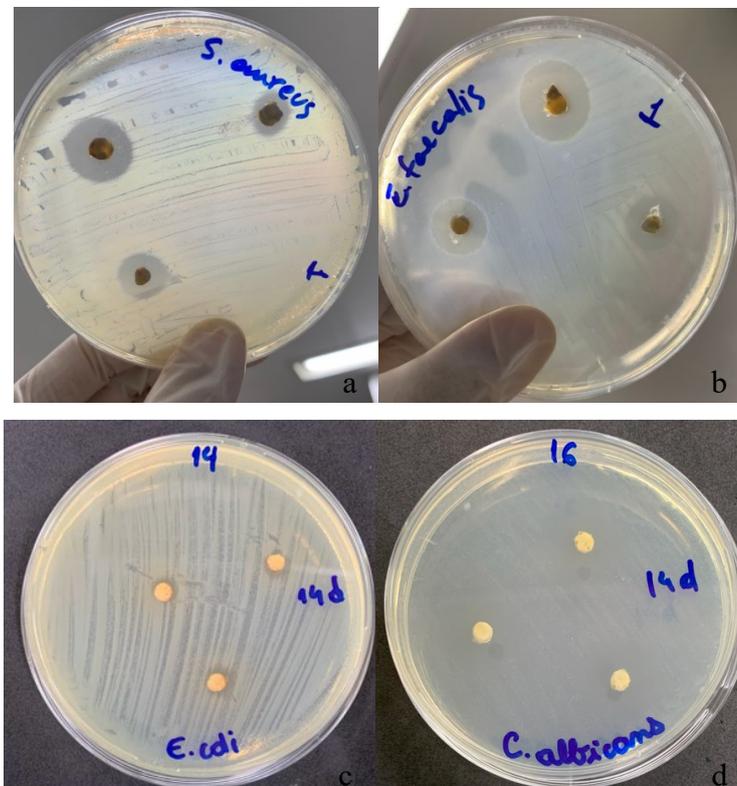
branco algodinoso e reverso branco; e o grupo 10 formado pelo isolado “23” com micélio filamentosso branco algodinoso, e reverso amarelo.

Apenas os isolados com potencial inibitório avaliados nos testes a seguir tiveram sua identidade revelada.

5.3 Screening preliminar (teste do ágar plug)

Os 24 isolados foram utilizados no ensaio preliminar do *ágar plug test* para avaliação do potencial inibitório de cada isolado. O teste foi feito com 7 e com 14 dias de crescimento de cada isolado. Halos de inibição bacteriana de variados tamanhos foram observados em 11 dos isolados, alguns dos halos de inibição são mostrados na figura 7.

Figura 7 - Halos de inibição ao redor dos plugs contendo as colônias fúngicas crescidas com 7 dias (a, b) e com 14 dias (c, d). Avaliação feita 24h após inoculação do microrganismo teste e incubação



Fonte: AUTORA, 2024

Os testes feitos em triplicata têm seus halos (em milímetro) comparados nas tabelas 2, 3 e 4 a seguir:

Tabela 2 - Halos de inibição em milímetros causados pelos isolados fúngicos 1 a 24 cultivados por 7 e por 14 dias contra os microrganismos padrões *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*

Isolados	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
1	6,66±5,77	0	12,33±2,51	0	13,67±2,08	0,60±0,51
2	0	4,00±3,60	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	9,66±1,52	0	13,67±0,57	10,00±1,00	11,33±1,52	9,00±0,00
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	6,33±0,57	5,66±0,57	0	10,00±1,0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	2,00±3,46	0	7,00±1,00	5,66±4,04	4,66±4,16	5,66±4,93
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	4,00±6,92	10,33±3,21	10,67±1,52	4,33±3,78
12	0	0	0	0	0	0
13	3,00±5,19	0	7,66±6,65	12,00±1,00	5,30±5,03	9,00±1,00
14	7,00±1,00	0	9,00±1,00	12,00±2,64	8,00±0,00	10,67±0,5
15	0	0	13,33±2,08	7,33±0,57	9,33±2,08	7
16	4,33±3,78	0	10,00±1,00	10,33±0,57	9,33±2,08	7,33±1,25
17	0	0	14,00±2,00	14,00±1,00	9,33±0,57	6,67±0,57
18	0	0	0	0	0	9,33±0,57
19	0	0	6,33±1,52	5,33±0,57	7,00±1,00	0
21	0	0	0	0	0	6,00±0,00
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0

Fonte: AUTORA, 2024

Tabela 3 - Halos de inibição em milímetros causados pelos isolados fúngicos 1 a 24 cultivados por 7 e por 14

dias contra os microrganismos padrões *V. cholerae* e *C. albicans*

Isolados	<i>V. cholerae</i>		<i>C. albicans</i>	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
1	8,00±2,64	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	6,33±0,57	0	0	0
10	0	0	0	0
11	3,00±5,19	8,67±0,57	0	0
12	0	0	0	18,00±1,72
13	4,33±20,87	5,66±4,93	0	5,33±9,23
14	0	7,33±0,57	0	26,33±4,04
15	7,00±1,00	7,00±1,00	0	22,33±5,13
16	6,00±0,00	6,67±0,57	0	21,67±2,08
17	0	9,33±0,57	0	26,33±1,52
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
21	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0

Fonte: AUTORA, 2024

Tabela 4 - Halos de inibição em milímetros causados pelos isolados fúngicos 1 a 24 cultivados por 7 e por 14

dias contra os microrganismos padrões *P. aeruginosa* e *S. enterica*

Isolados	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. enterica</i>	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
21	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0

Fonte: AUTORA, 2024

Seis isolados foram capazes de inibir *E. coli*, a maioria deles cultivados por 7 dias, apenas o isolado 2 foi capaz de causar inibição num cultivo de 14 dias. Já a inibição em *S. aureus* e em *E. faecalis* foi exercida por onze dos isolados testados, a maioria deles (dez isolados) nos dois tempos de cultivo. Em *V. cholerae* oito isolados exerceram inibição, quatro deles tanto no cultivo de 7 quanto no de 14 dias. No fungo leveduriforme *Candida albicans*, 6 dos isolados exerceram inibição, apenas dos cultivados por catorze dias.

Em *P. aeruginosa* e *S. entérica* nenhum dos isolados foi capaz de inibir seus crescimentos. É importante ressaltar que esses resultados se referem a inibição causada pelo contato direto do micélio fúngico crescido com as cepas em teste, o efeito é resultado da produção natural do fungo sem nenhum tipo de processamento do agente bioativo.

Por se tratar de uma amostra em estado natural bruto, a verificação do halo causado pelos isolados configura um resultado qualitativamente positivo, dessa forma, dez isolados fúngicos foram utilizados na produção dos extratos para uma investigação mais aprofundada.

5.4 Produção dos extratos orgânicos

Os dez isolados, que inibiram os microrganismos teste no *screening* preliminar, foram utilizados na produção dos extratos orgânicos, resultando em diferentes quantidades de massa, conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Massa obtida dos extratos de cada isolado. Os números correspondem ao isolado a partir de onde foi originado o extrato.

Extratos	Peso (mg)
1	24,7
4	25,3
6	25,6
9	19,6
11	29,6
14	77,9
15	18,6
16	49,5
17	38,7
19	78,0

Fonte: AUTORA, 2024

Os isolados com maior massa obtida foram 19, 14, e 16, respectivamente.

A seguir é possível visualizar os diferentes pigmentos presentes nos extratos:

Figura 8 - Funil de separação contendo as frações orgânicas (superior) e aquosas (inferior) dos extratos 1 e 14, onde é possível observar a

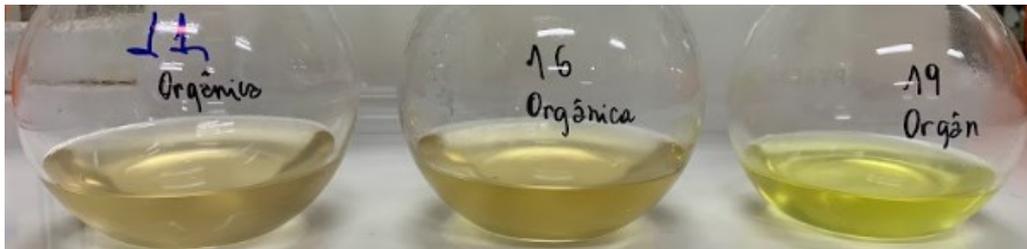
diferença de coloração entre as fases dos diferentes extratos.



Fonte: AUTORA, 2024

Após a separação das fases é possível visualizar melhor as diferenças nas colorações (Figura 14):

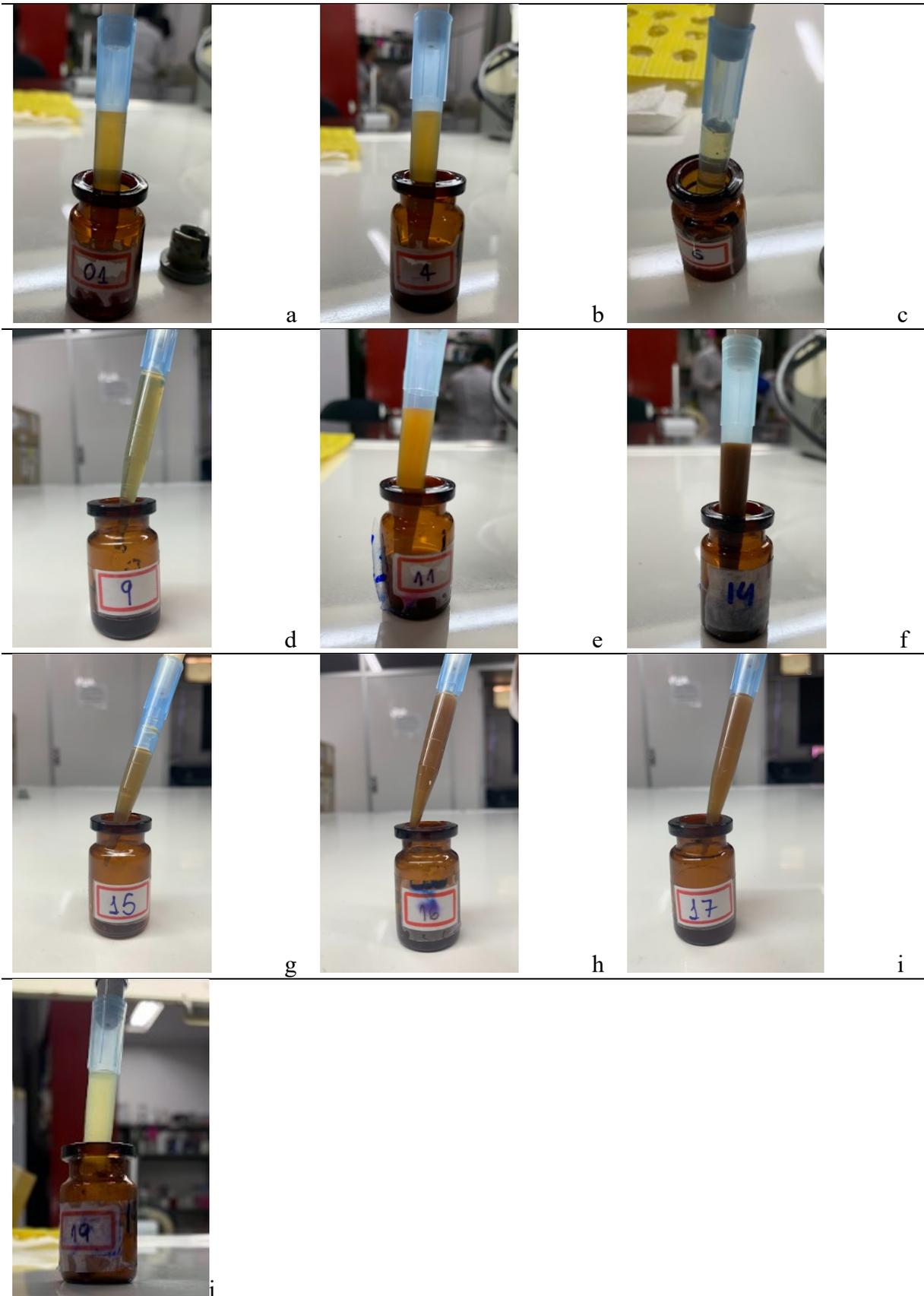
Figura 9 –Frações orgânicas pós extração com acetato de etila evidenciando as diferenças nas cores obtidas.



Fonte: AUTORA, 2024

Seguindo a concentração em rotaevaporador e dissolução das massas obtidas, as diferenças de cores e pigmentos foram mantidas, como visto na figura 15:

Figura 10 - Extratos finalizados e suas diferenças de colorações e texturas. As figuras a-j correspondem aos extratos das amostras 1, 4, 6, 9, 11, 14, 15, 16, 17 e 19 respectivamente.



5.5 CIM, CBM e IC50 dos extratos orgânicos

Os índices de inibição calculados para os extratos foram CIM, CBM e IC50. Os três índices representam concentrações nas quais algum efeito é produzido. Dessa forma, o extrato de melhor potencial inibitório é aquele que consegue o efeito desejado na menor concentração. Por esse motivo, os resultados mais promissores são aqueles onde os extratos exercem efeitos nos menores índices obtidos.

A CIM se refere à menor concentração de uma substância capaz de inibir visivelmente o crescimento de microrganismos (CLSI, 2021). As CIMs obtidas são comparadas na tabela 6.

Tabela 6 – Valores de CIM em µg/ml dos extratos testados frente aos microrganismos indicadores.

Extrato	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>C. albicans</i>
E1	≤500	≤125	≤250	≤125	*
E4	≤500	≤500	≤125	≤62.5	*
E6	≤500	≤250	≤125	≤62.5	*
E9	≤500	≤62.5	≤62.5	≤62.5	*
E11	≤250	≤125	≤500	≤250	*
E14	≤250	≤500	≤500	≤1000	*
E15	≤250	≤1000	≤500	≤250	*
E16	≤250	≤500	≤1000	*	*
E17	≤500	≤500	≤500	≤1000	*
E19	*	≤1000	≤500	*	*

*CIM não identificado, houve crescimento em todas as concentrações testadas.

Fonte: AUTORA, 2023

Nota-se que os menores valores das CIMs foram atingidos pelos extratos 4, 6, e 9. A maioria dos extratos foi capaz de exercer efeito visível registrado pela CIM nos microrganismos de diferentes paredes celulares (Gram positivo e Gram negativo), caracterizando uma ação inibitória de amplo espectro. Os menores índices inibitórios foram registrados repetidas vezes contra a bactéria *V. cholerae*. Foi percebido ainda que nenhum dos extratos foi capaz de causar inibição contra a levedura *C. albicans*.

A CBM, que se refere à concentração que mata 99,9% (CLSI, 2021) do inóculo, pode ser vista na Figura 7.

Tabela 7 - Valores de CBM em $\mu\text{g/ml}$ dos extratos testados frente aos microrganismos indicadores.

Extrato	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>C. albicans</i>
E1	*	≤ 500	≤ 1000	≤ 250	*
E4	≤ 1000	*	≤ 500	≤ 250	*
E6	≤ 500	≤ 1000	≤ 125	≤ 62.5	*
E9	≤ 500	≤ 500	≤ 250	≤ 62.5	*
E11	≤ 500	*	≤ 1000	*	*
E14	*	*	≤ 1000	≤ 1000	*
E15	≤ 500	*	≤ 1000	*	*
E16	*	≤ 1000	*	*	*
E17	≤ 1000	≤ 1000	*	*	*
E19	*	≤ 1000	*	*	*

*CBM não identificado, houve crescimento em todas as concentrações testadas.

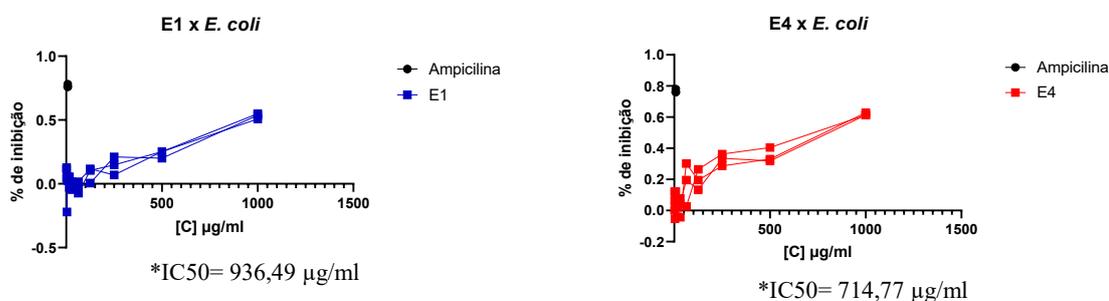
Fonte: AUTORA, 2023

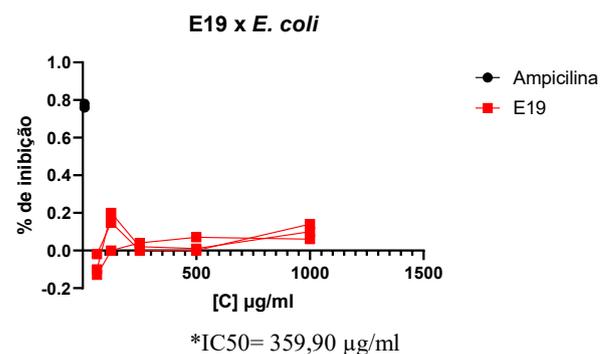
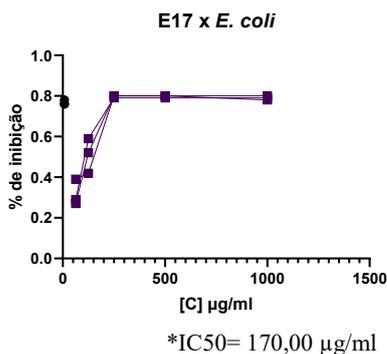
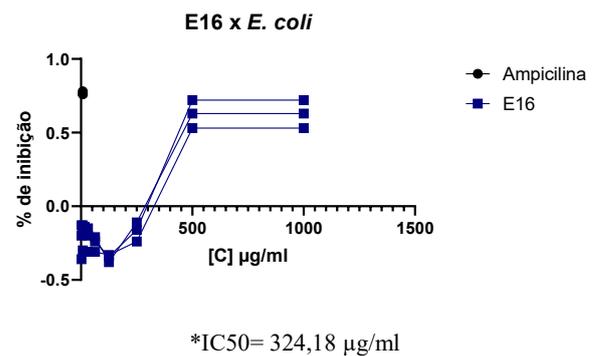
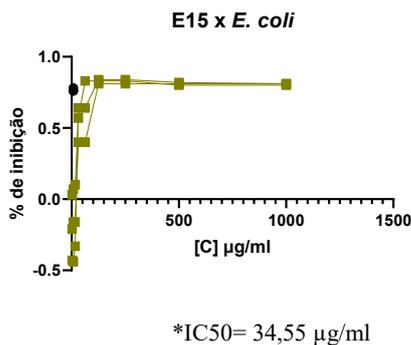
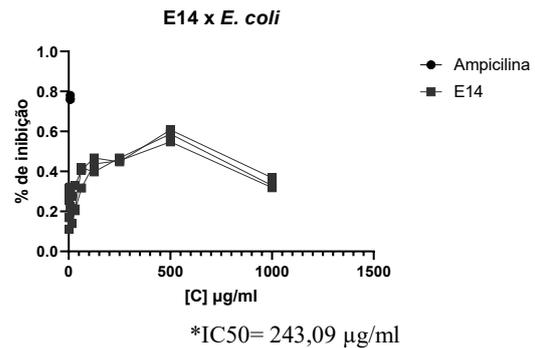
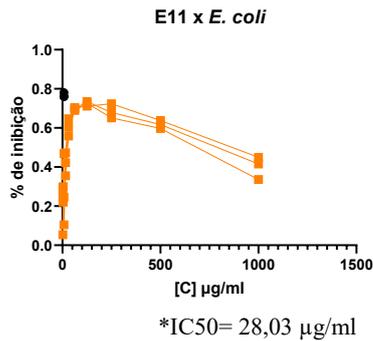
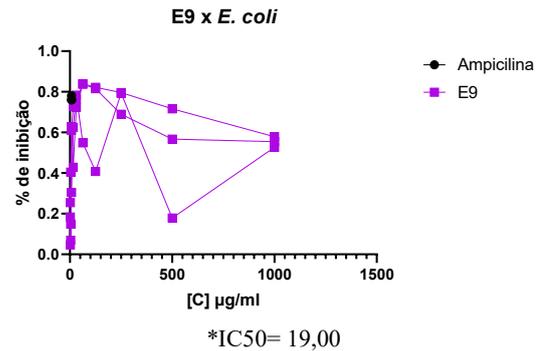
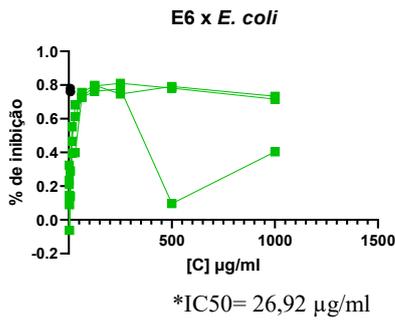
Mais uma vez é possível perceber que os extratos exerceram ação mais potente na cepa padrão de *V. cholerae*. As menores CBMs foram atingidas pelos extratos 6 e 9 no referido microrganismo.

Já a IC₅₀ se refere à concentração capaz de eliminar 50% do inóculo (JAYATILAKE; MUNASINGHE, 2020). Para esta avaliação, os dados foram transformados em percentuais de inibição de cada extrato frente aos microrganismos teste, e foi plotado um gráfico dose-resposta, a partir de onde foi identificado a concentração capaz de inibir 50% dos indivíduos (IC₅₀).

A IC₅₀ frente a *E. coli* e sua resposta ao longo das concentrações testadas dos extratos pode ser vista nas imagens a seguir:

Figura 11 - Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à *E. coli*.





Fonte: AUTORA, 2023

Os gráficos exibem uma resposta variada entre os extratos. Em alguns é possível perceber a tendência de aumento do percentual de inibição concomitante com o aumento da concentração, e em outros a resposta parece não ser relacionada com o aumento da concentração. Para identificar o grau de relacionamento entre as variáveis X ($[C]$ µg/ml) e Y (% de inibição), foi feita uma análise de regressão linear:

Tabela 8 – Índices da regressão linear dos extratos em relação à *E. coli*

Extratos	R ²	P value
E1	0,8427	<0,0001
E4	0,8401	<0,0001
E6	0,0931	0,1010
E9	0,0079	0,6404
E11	0,0134	0,5418
E14	0,1672	0,0248
E15	0,3226	0,0011
E16	0,7629	<0,0001
E17	0,4419	0,0069
E19	0,1566	0,1443

Fonte: AUTORA, 2023

Os valores de R² da análise indicam que apenas nos extratos E1, E4, e E16, há uma boa relação entre as variáveis analisadas. Ou seja, nestes extratos, o aumento do percentual inibitório está estatisticamente relacionado ao aumento da concentração do extrato.

Os extratos com inibição significativa tiveram suas variações analisadas por ANOVA com post-hoc de Tukey's, e seus índices inibitório comparados a seguir:

Figura 12 - IC50 dos extratos inibitórios em *E. coli*. Letras diferentes representam variâncias significativas segundo o post-hoc de Tukey.

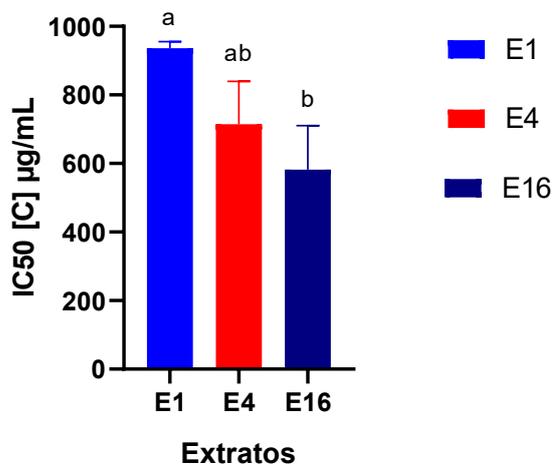


Tabela 9 – Comparação dos índices inibitórios em µg/ml dos extratos significativos em *E. coli*.

Extrato	IC50	CIM	CBM
E1	936,50	≤500	*
E4	714,77	≤500	≤1000
E16	582,09	≤250	*

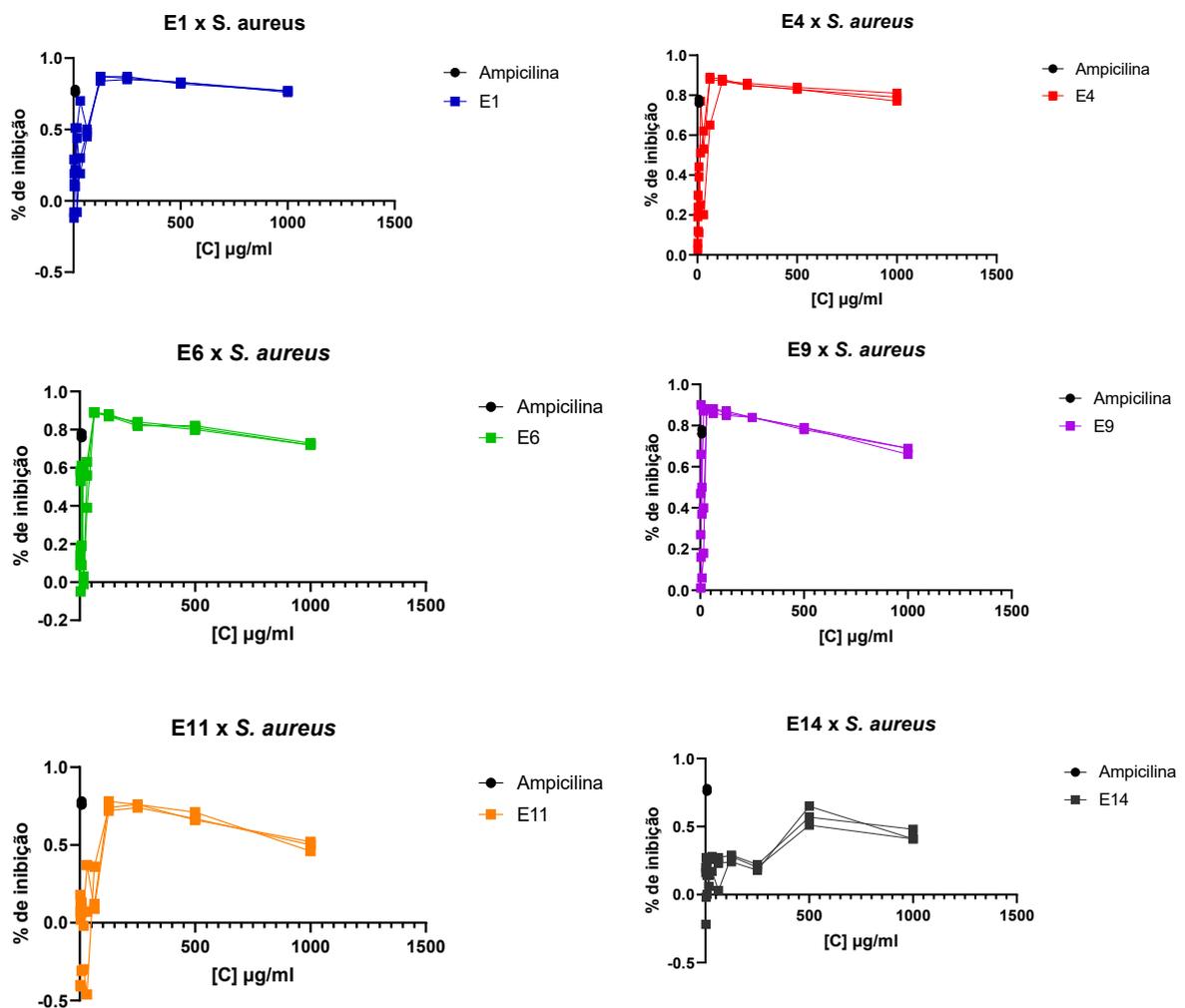
*Extrato não exerceu efeito bactericida

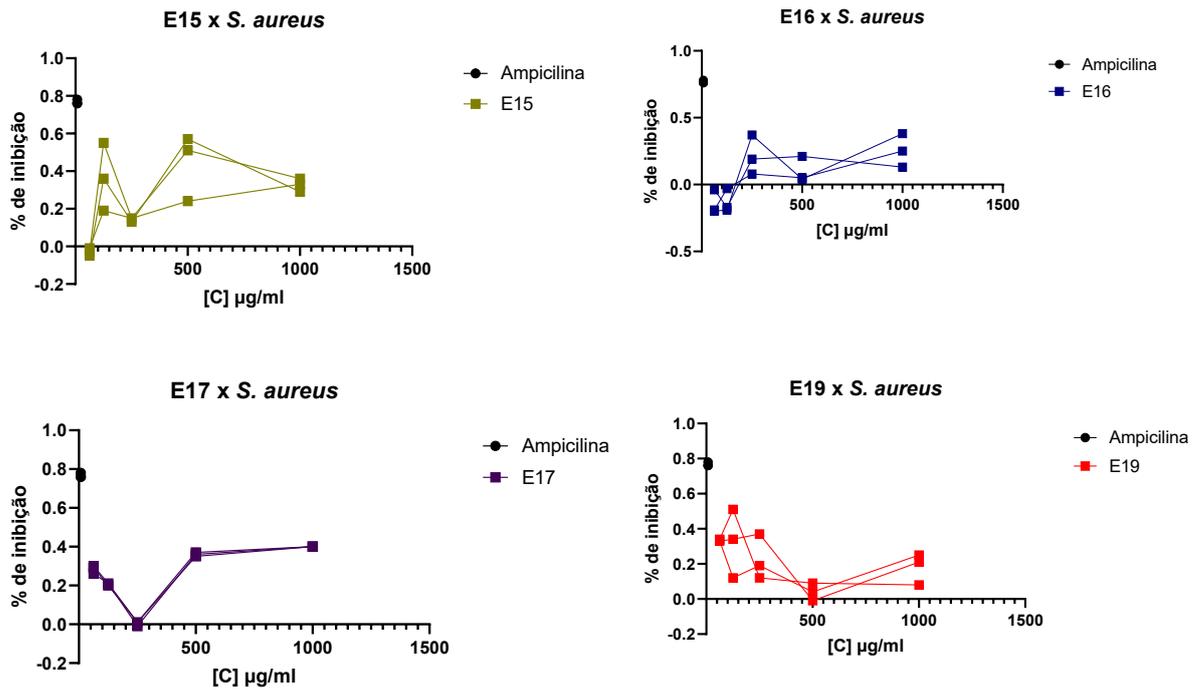
Fonte: AUTORA, 2023

A análise de variância com post-hoc de Tukey revelou uma variação significativa entre E1 e E16. Comparando-se todos os índices inibitório analisados, o extrato 16 foi considerado como o de melhor potencial inibitório frente à *E. coli*, seguido dos extratos 4, e 1 nesta ordem.

Os mesmos procedimentos foram aplicados para todos os microrganismos teste utilizados neste estudo. A seguir são mostradas as curvas dose-resposta dos extratos frente à *S. aureus*:

Figura 13 - Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à *S. aureus*





Fonte: AUTORA, 2023

A análise de regressão linear para avaliação da relação entre as variáveis não mostrou nenhuma relação significativa entre a variação da concentração do extrato e a porcentagem de inibição celular, portanto os índices inibitórios não foram avaliados.

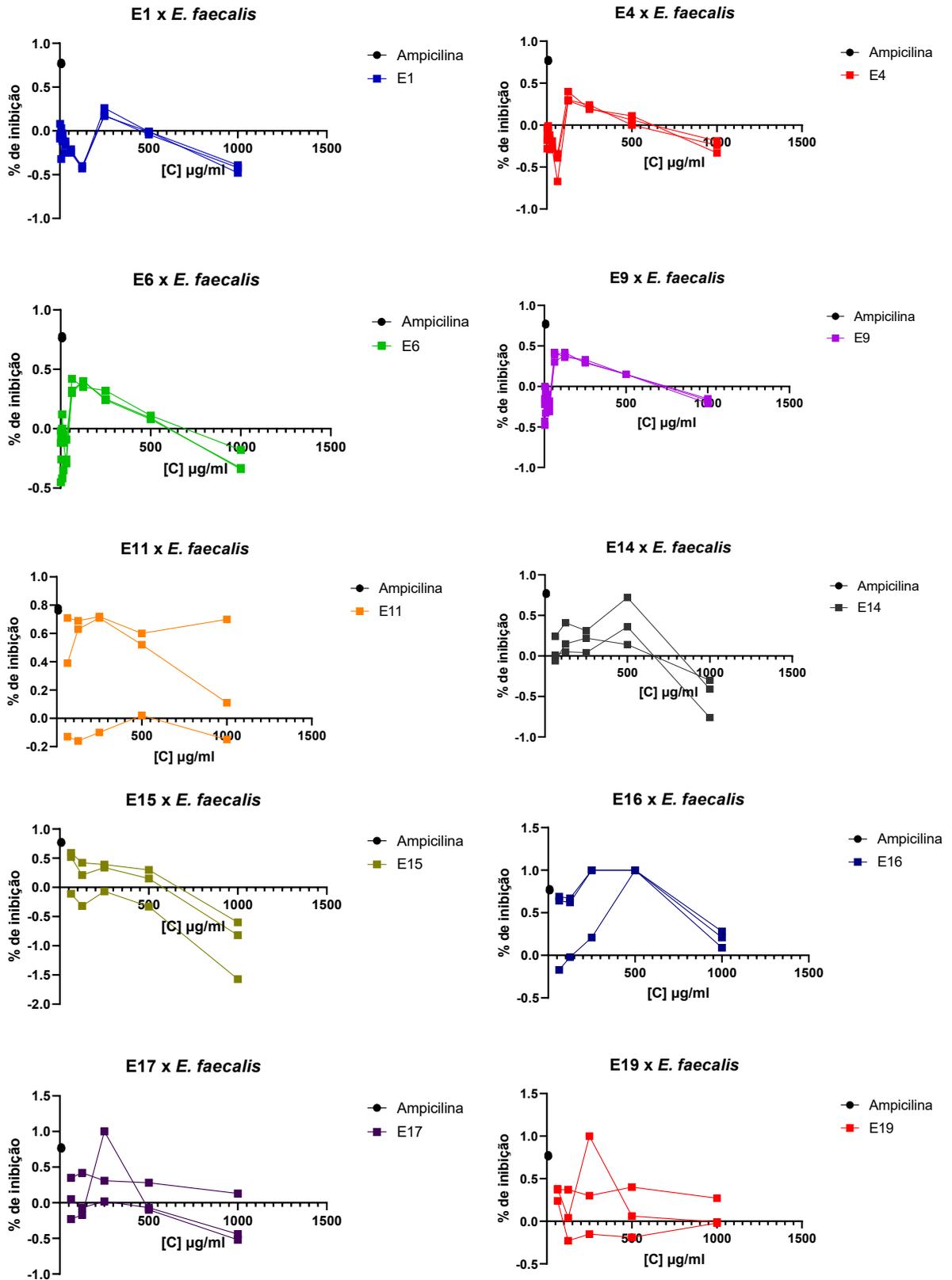
Tabela 10 - Índices da regressão linear dos extratos em relação à *S. aureus*

Extratos	R ²	p
E1	0,322	0,001
E4	0,249	0,005
E6	0,168	0,025
E9	0,045	0,258
E11	0,257	0,004
E14	0,433	<0,0001
E15	0,187	0,107
E16	0,450	0,006
E17	0,335	0,024
E19	0,204	0,091

Fonte: AUTORA, 2023

A seguir são mostradas as curvas dose-resposta dos extratos frente à *E. faecalis*:

Figura 14 - Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à *E. faecalis*.



Fonte: AUTORA, 2023

A análise de regressão linear para *E. faecalis* mostrou relação significativa em apenas um dos extratos, o E15:

Tabela 11 - Índices da regressão linear dos extratos em relação à *E. faecalis*

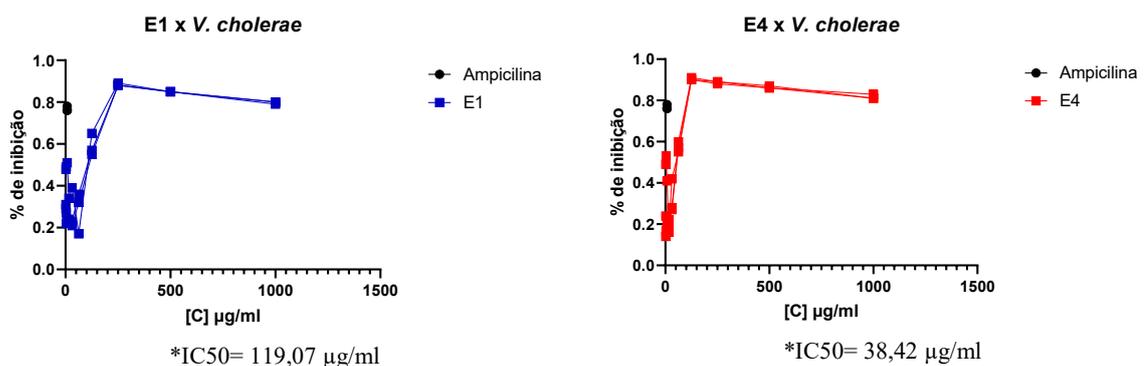
Extratos	R ²	p
E1	0,1106	0,0725
E4	0,0000	0,9847
E6	0,0180	0,4798
E9	0,0022	0,8074
E11	0,0219	0,5989
E14	0,3565	0,0188
E15	0,6284	0,0004
E16	0,0246	0,5770
E17	0,1754	0,1202
E19	0,0507	0,4196

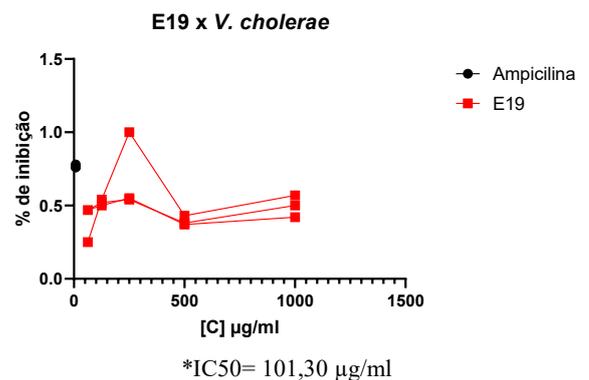
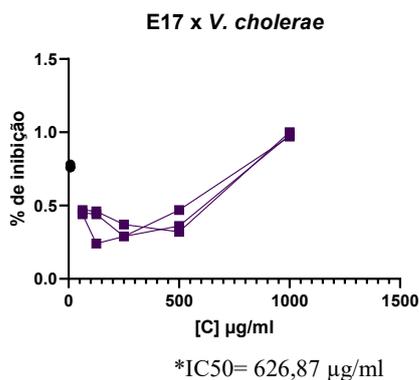
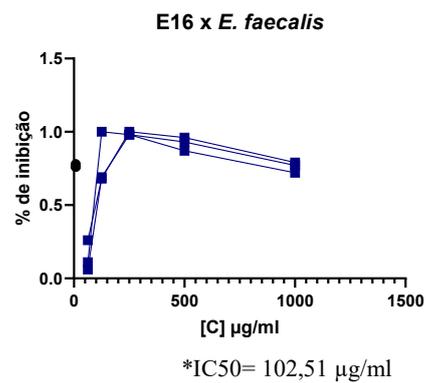
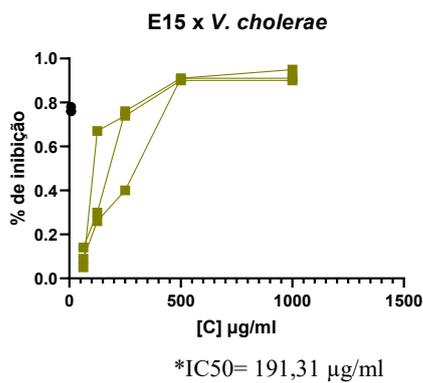
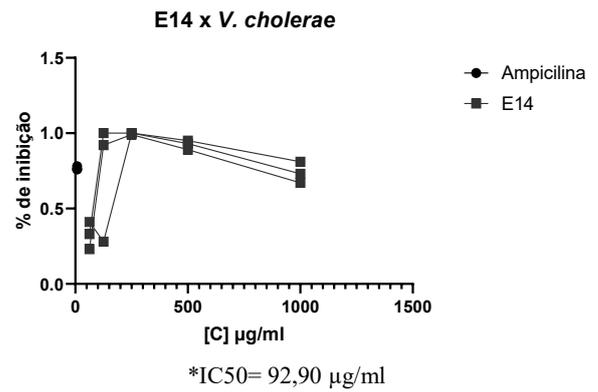
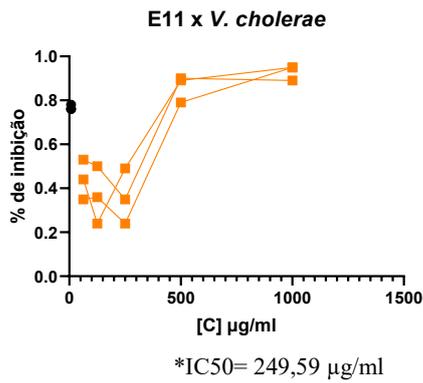
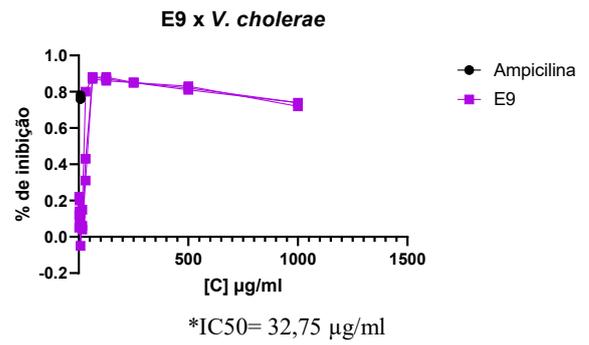
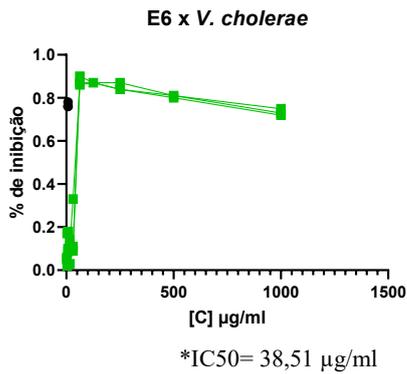
Fonte: AUTORA, 2023

Porém, como pode ser visto no gráfico, os valores de inibição foram negativos, o comportamento da célula em relação ao aumento da concentração do extrato foi de aumentar a densidade celular. Dessa forma, o extrato agiu como um componente que promoveu o crescimento, e não a inibição, portanto os índices inibitórios não foram comparados. É necessário mais investigações, mas pode-se perceber um efeito de estímulo ao crescimento celular em *E. faecalis*.

A seguir, são mostradas as curvas dose-resposta dos extratos frente à *V. cholerae*:

Figura 15 - Gráfico dose-resposta dos 10 extratos fúngicos frente à *V. cholerae*





Fonte: AUTORA, 2023

Para *V. cholerae*, os dados da regressão linear apresentaram uma boa relação entre as concentrações dos extratos e os percentuais de inibição nos extratos E1, E11, E15, E17:

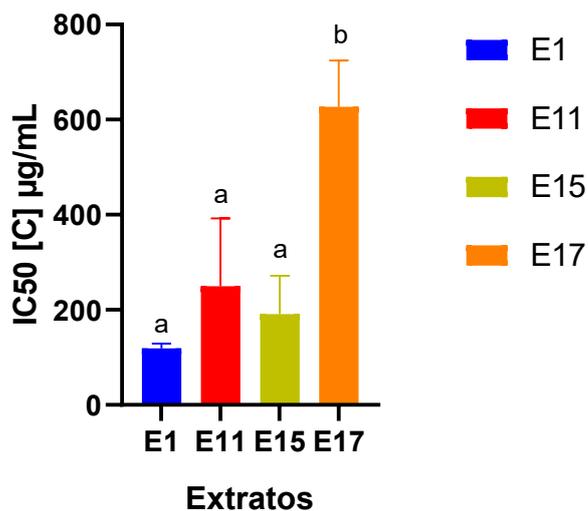
Tabela 12 - Índices da regressão linear dos extratos em relação à *V. cholerae*

Extratos	R ²	p
E1	0,5155	<0,0001
E4	0,3794	0,0003
E6	0,2761	0,0029
E9	0,2346	0,0067
E11	0,7129	<0,0001
E14	0,0644	0,3613
E15	0,6029	0,0007
E16	0,1146	0,2171
E17	0,6922	0,0001
E19	0,0023	0,8652

Fonte: AUTORA, 2023

Os extratos com inibição significativa tiveram suas variações analisadas por ANOVA com post-hoc de Tukey, e seus índices inibitório comparados a seguir:

Figura 16 - IC50 dos extratos inibitórios em *V. cholerae*. Letras diferentes representam variâncias significativas segundo o post-hoc de Tukey.



Fonte: AUTORA, 2023

Tabela 13 - Comparação dos índices inibitórios em µg/ml dos extratos significativos em *V. cholerae*

Extrato	IC50	CIM	CBM
E1	119,01	≤125	≤250
E11	249,59	≤250	*
E15	191,31	≤250	*
E17	626,87	≤1000	*

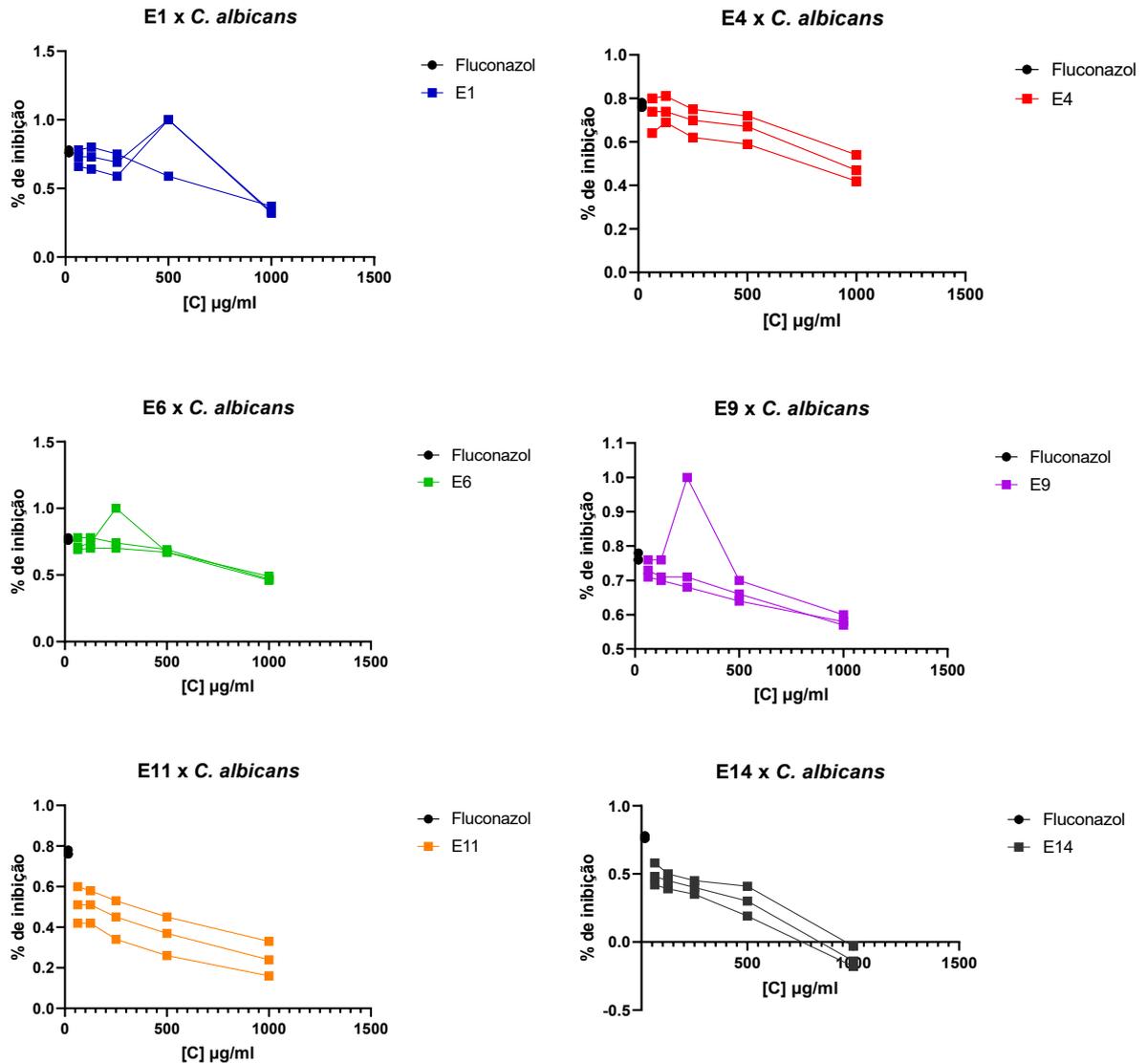
*Extrato não exerceu efeito bactericida.

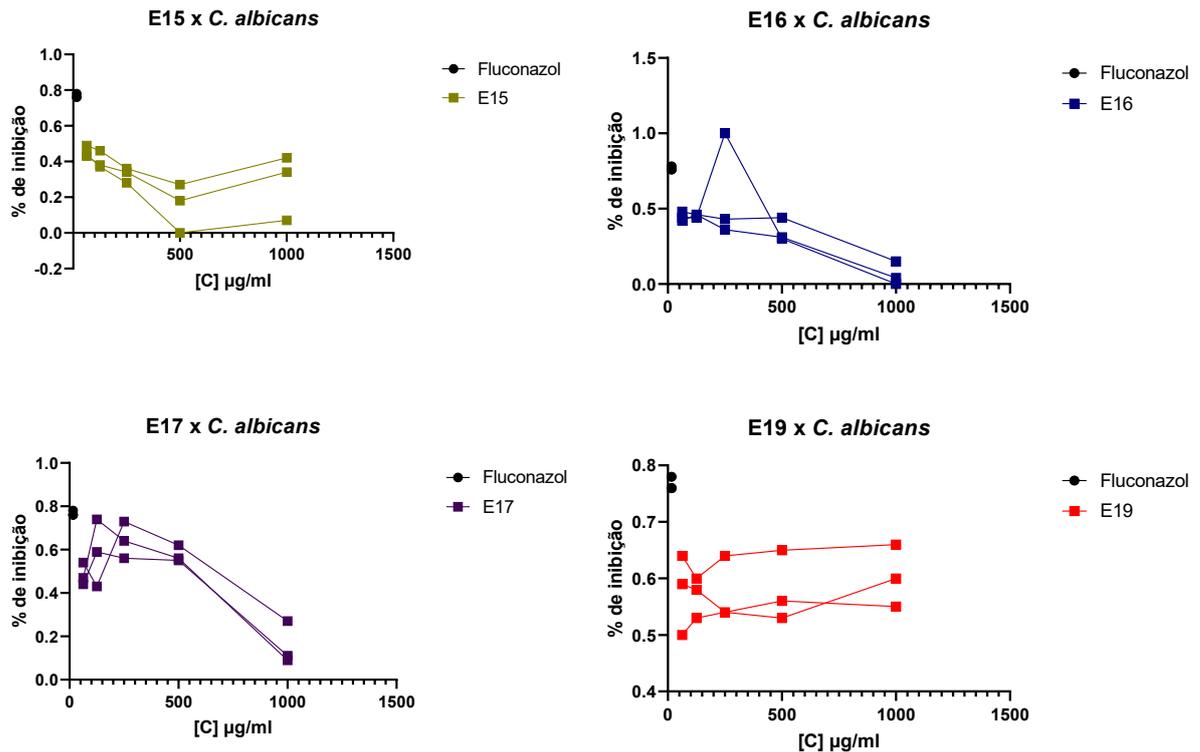
A análise de variância com post-hoc de Tukey revelou uma variação significativamente diferente entre o extrato 17 e os outros (1, 11, e 15,) que não mostraram significância entre si. Comparando-se todos os índices inibitório analisados, o extrato 1 foi considerado como o de

melhor potencial inibitório frente à *V. cholerae*, seguido dos extratos 15,11 como segundo melhores, e por último o 17.

A seguir, são mostradas as curvas dose-resposta dos extratos frente à *C. albicans*:

Figura 17 - Gráfico dose-resposta dos 10 extratos frente à *C. albicans*





Fonte: AUTORA, 2023

Para *C. albicans*, os dados da regressão linear apresentaram uma boa relação entre as concentrações dos extratos e os percentuais de inibição nos extratos E4, E6, E11, E14 e E17:

Tabela 14 - Índices da regressão linear dos extratos em relação à *C. albicans*

Extratos	R ²	p
E1	0,3875	0,0132
E4	0,7249	<0,0001
E6	0,6171	0,0005
E9	0,3952	0,0121
E11	0,6408	0,0003
E14	0,8986	<0,0001
E15	0,2286	0,0715
E16	0,4968	0,0033
E17	0,5403	0,0018
E19	0,0523	0,4121

Fonte: AUTORA, 2023

Assim como aconteceu em *E. faecalis*, os valores de inibição dos extratos com relação significativa foram negativos, resultando em aumento da densidade celular. Este efeito observado não é benéfico uma vez que se trata de células de microrganismos patogênicos, como é o caso de *E. faecalis* e *C. albicans*.

É interessante notar que os efeitos inibitórios significativos foram verificados apenas nas bactérias Gram-negativas, o que é um resultado positivo uma vez que a tendência atual é priorizar substâncias com ação direcionada a grupos mais restritos, devido ao maior potencial de indução de resistências verificado nos antimicrobianos de amplo espectro. A seguir é apresentado um sumarização dos extratos que foram capazes de exercer efeito inibitório significativo para cada um dos microrganismos testados:

Tabela 15 - Quantidade de microrganismos significativamente inibidos por cada extrato e suas origens.

Extrato	Alga	Origem anatômica	MO Inibido*	Bactéria indicadora inibida*
E1	<i>Caulerpa Racemosa</i>	Epifítico	2	<i>E. coli</i> , <i>V. cholerae</i>
E4	<i>Caulerpa Racemosa</i>	Epifítico	1	<i>E. coli</i>
E11	<i>Gracilaria Ferox</i>	Epifítico	1	<i>V. cholerae</i>
E15	<i>Criptonemia Crenulata</i>	Endofítico	1	<i>V. cholerae</i>
E16	<i>Padina Gymnospora</i>	Epifítico	1	<i>E. coli</i>
E17	<i>Padina Gymnospora</i>	Epifítico	1	<i>V. cholerae</i>

* Microrganismos inibidos com significância estatística.

Fonte: AUTORA, 2023

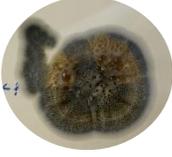
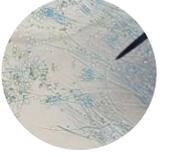
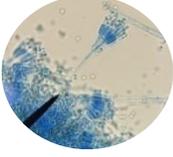
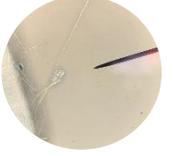
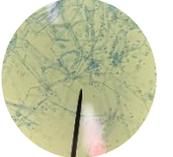
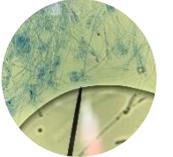
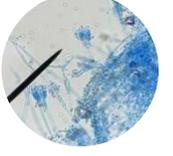
A maioria dos extratos que exibiram inibição significativa foram produzidos a partir de isolados que colonizam a superfície das macroalgas, os epifíticos (E1, E4, E11, E16 e E17). Apenas o extrato E15 foi obtido de um isolado endofítico. Das cinco algas coletadas, quatro apresentaram pelo menos um microrganismo com atividade inibitória significativa identificada neste estudo, sendo a *Caulerpa Racemosa* a que apresentou um isolado capaz de inibir mais de uma espécie de microrganismo indicador.

5.6 Identificação morfológica dos fungos com inibição significativa

A morfologia de todos os isolados que apresentaram inibição significativa são semelhantes. O isolados cultivados em ágar batata, apresentaram no início do cultivo (primeiros

3 dias), colônias brancas, a medida que a colônia foi crescendo, seu micélio foi se mostrando de cor verde no anverso, e castanho no reverso, como se vê nas imagens da tabela 16:

Tabela 16 – Características morfológicas do micélio em cultivo (características macorscópicas) e dos conidióforos (características microscópicas)

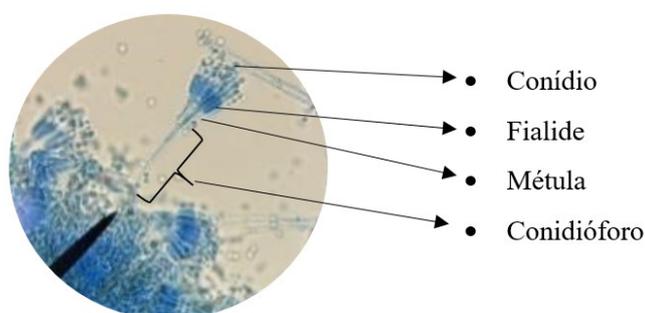
Isolado	Aspecto macroscópico		Aspecto microscópico	Gênero identificado
	Anverso	Reverso	X100	
1				<i>Talaromyces</i>
4				<i>Talaromyces</i>
11				<i>Talaromyces</i>
15				<i>Talaromyces</i>
16				<i>Talaromyces</i>
17				<i>Talaromyces</i>

Fonte: AUTORA, 2023

As características maduras da colônia foram: colônia filamentosa pulverulenta verde com bordas brancas, com presença de exudato oleoso e amarelado. O reverso tem cor castanho, e não apresentou pigmento solúvel (CHRISTIANA; HIDEKI; JAMES, 2017).

Microscopicamente os fungos apresentam hifas longas, septadas, hialinas. Foi possível observar os conidióforos em todos os isolados identificados, sendo caracterizados como biverticilados, com 3 a 6 fialides acerosas (formato alongado semelhante a um cone) por métulas. Conídios unicelulares globosos ligeiramente elipsoides (WANG, Q. M. *et al.*, 2016; YILMAZ *et al.*, 2014). A seguir é exibido em detalhes as características microscópicas da estrutura reprodutora:

Figura 18 – Características micromorfológicas de *Talaromyces sp.* Detalhes evidenciando sua estrutura reprodutora.

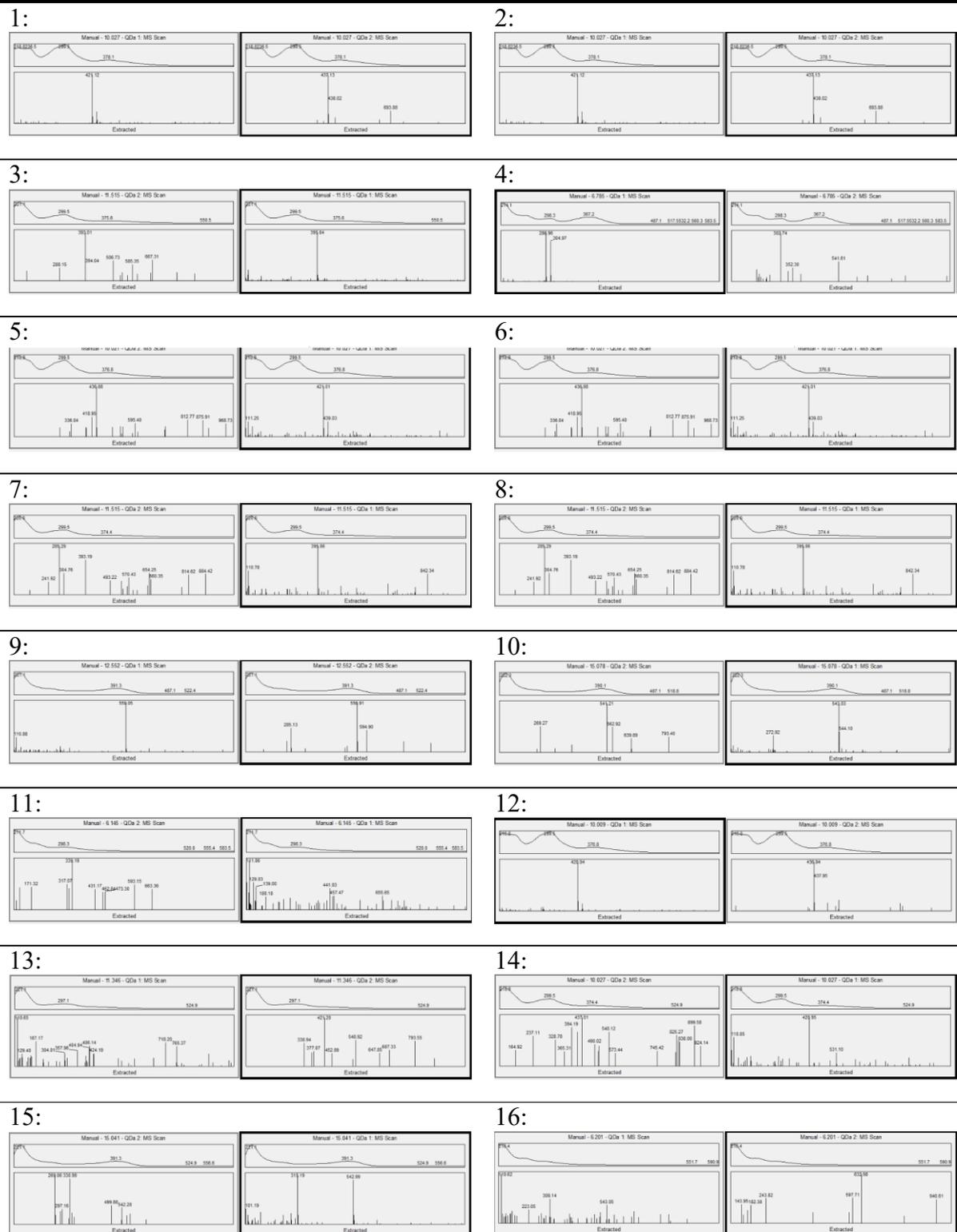


Fonte: AUTORA, 2023

5.7 Identificação dos compostos presentes nos extratos com inibição significativa.

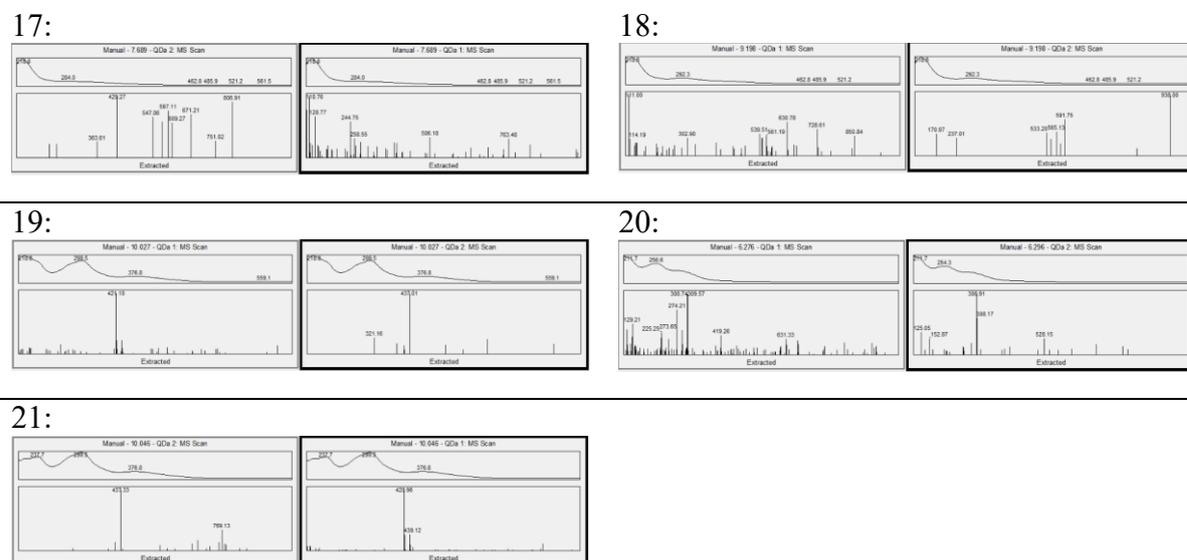
Os isolados E1, E4, E11, E15, E16 e E17, que apresentaram potencial inibitório significativo, foram submetidos a análise de UPLC, a partir de onde foram identificados os seguintes compostos: pensulfonoxy, purpurquinone A, ergosta-5,7,9 (11), 22-tetraen-3 β -ol, talaroisocoumarina A, rugulosina D, rugulosina A, abeopyrenulin, 4-methyl-2-oxo-(1H)-pyrimidine, 8-dihydroxy-10-O-methylendryol E. A tabela 17 mostra os espectrômetros de massa obtidos dos extratos fúngicos que apresentaram inibição significativa. Os compostos identificados tem suas características especificadas na tabela 18:

Tabela 17 – Espectros de massas dos extratos acetotetanólicos de isolados do gênero *Talaromyces* obtidos por análise de UPLC.



(Continua)

Tabela 17 – Espectros de massas dos extratos acetoetanólicos de isolados do gênero *Talaromyces* obtidos por análise de UPLC



(Conclusão)

Fonte: AUTORA, 2023

Tabela 18 - Caracterização dos metabólitos presentes no extrato acetoetanólico de isolados do gênero *Talaromyces* por análise de UPLC.

n	Extrato	Composto	TR*	FM*	m/z*	λ^*	Ref.:
1	1	Pensulfonox y	10.027	C ₁₈ H ₂₂ O ₈ S	420	299,5/ 378.1	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023
2	1	Purpurquino ne A	10.027	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	438	376.8	Yilmaz <i>et al.</i> , 2014
3	1	Ergosta- 5,7,9 (11), 22-tetraen- 3 β -ol	11.515	C ₂₈ H ₄₂ O	394	299,5/ 375,6	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023

(Continua)

Tabela 18 - Caracterização dos metabólitos presentes no extrato acetoetanólico de isolados do gênero *Talaromyces* por análise de UPLC.

(Continuação)

4	4	Talaroisoco umarina A	6.785	$C_{14}H_{16}NaO_5$	286	298.3	Ma <i>et al.</i> , 2020
5	4	Pensulfonox y	10.027	$C_{18}H_{22}O_8S$	420	299,5/ 376.8	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023
6	4	Purpurquino ne A	10.03	$C_{21}H_{20}O_9$	438	376.8	Yilmaz <i>et al.</i> , 2014
7	4	Ergosta- 5,7,9 (11), 22-tetraen- 3 β -ol	11.515	$C_{28}H_{42}O$	394	299,5/ 374.4	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023
8	4	Talaroisoco umarina A	11.515	$C_{14}H_{16}NaO_5$	286	299.5	Ma <i>et al.</i> , 2020
9	4	Rugulosina D	12.552	$C_{30}H_{23}O_{11}$	558	391,3	Song <i>et al.</i> , 2022
10	4	Rugulosina A	15.078	$C_{30}H_{22}O$	542	390.1	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023
11	11	Abeopyrenu lin	6.145	$C_{16}H_{14}O_7$	340	298.3	Liang <i>et al</i> 2021
12	11	Pensulfonox y	10.009	$C_{18}H_{22}O_8S$	420	299,5/ 376,8	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023
13	11	4-Methyl-2- oxo-(1H)- pyrimidine	11.346	$C_5H_6N_2O$	110	221,1	Kumari <i>et al.</i> , 2018
14	15	Pensulfonox y	10.027	$C_{18}H_{22}O_8S$	420	299,5/ 374,4	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023

Tabela 18 - Caracterização dos metabólitos presentes no extrato acetoeetanólico de isolados do gênero *Talaromyces* por análise de UPLC.

15	15	Rugulosina A	15.041	C ₃₀ H ₂₂ O	542	391.3	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023
16	16	4-Methyl-2- oxo-(1H)- pyrimidine	6.201	C ₅ H ₆ N ₂ O	110	216.4	Kumari <i>et al.</i> , 2018
17	16	4-Methyl-2- oxo-(1H)- pyrimidine	7.689	C ₅ H ₆ N ₂ O	110	218.8	Kumari <i>et al.</i> , 2018
18	16	4-Methyl-2- oxo-(1H)- pyrimidine	9.198	C ₅ H ₆ N ₂ O	110	218.8	Kumari <i>et al.</i> , 2018
19	16	Pensulfonox y	10.027	C ₁₈ H ₂₂ O ₈ S	420	299,5 /376,8	Nicoletti <i>et al.</i> , 2023
20	17	8-dihydroxy-10- O- methyldendryol E ou 1-Docosene	6.269	C ₁₆ H ₂₀ O ₆	308	256.6	Kumari <i>et al.</i> , 2018
21	17	Purpurquino ne A	10.046	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	438	376.8	Yilmaz <i>et al.</i> , 2014

(Conclusão)

*TR= Tempo de Retenção; FM= Fórmula molecular; m/z= razão massa/carga; λ = comprimento de onda

Fonte: AUTORA, 2023

6 DISCUSSÃO

A praia da Pedra Rachada localizada no município de Paracuru é considerada um verdadeiro banco de algas, e por isso foi escolhida como local para coleta. Foi possível obter facilmente representantes dos principais filos de algas marinhas, devido a alta diversidade local, já conhecida e explorada.

Algas marinhas são conhecidas fontes de compostos bioativos, e cada vez mais, tem-se associado suas propriedades com a presença de microrganismos que colonizam e sobrevivem através de relações mutualísticas estabelecidas entre esses organismos. Sabe-se que fungos e bactérias vivem em associação com macroalgas e produzem compostos capazes de atuar no crescimento deste hospedeiro, influenciando diretamente no seu metabolismo (VEGA-PORTALATINO *et al.*, 2023). Neste trabalho foi possível isolar fungos a partir de todas as macroalgas coletadas.

Os bioativos produzidos por microrganismos associados a algas podem ter diversas funções, como antioxidantes (ŚLUSARCZYK; ADAMSKA; CZERWIK-MARCINKOWSKA, 2021; VITALE *et al.*, 2020), anticâncer (DESHMUKH; PRAKASH; RANJAN, 2018; PARTHASARATHY *et al.*, 2020), larvicida e mosquitocida (CHEN *et al.*, 2023; ZHAI *et al.*, 2016), citotóxica (SHEVKAR *et al.*, 2022), além de funções de inibição microbiológica (HANDAYANI *et al.*, 2019; LOOS, VAN DER; ERIKSSON; FALCÃO SALLES, 2019; SILVA; CARDOSO; MACEDO, 2022). Neste trabalho, foi possível observar 11 isolados fúngicos capazes de exercer inibição microbiana diretamente a partir de seus micélios. Os isolados foram selecionados para a produção de extratos, onde 6 deles foram capazes de inibir significativamente as bactérias Gram negativas *E. coli* e *V. cholerae*.

Um dos extratos foi capaz de inibir *E. coli* e *V. cholerae* concomitantemente, o extrato 1, produzido a partir do isolado fúngico 1 obtido da alga verde *Caulerpa racemosa*. O destaque das algas verdes (Filo Chlorophyta) que mantém relação ecológicas com espécies fúngicas de alto potencial inibitório microbiano, é atestado na revisão de Vega-Portalatino *et al.* (2023), que ao analisarem artigos científicos publicados nas principais bases de dados encontraram uma maior ocorrência de substâncias fúngicas com ação antimicrobiana entre isolados de espécimes pertencentes ao filo Chlorophyta.

Os 24 isolados fúngicos manipulados neste trabalho são pertencentes a pelo menos 10 gêneros diferentes, sendo o gênero *Talaromyces sp* predominante (45% foi identificado como *Talaromyces sp.*, os outros 55% pertenciam a pelo menos 9 gêneros diferentes). Diversos fatores vão influenciar na diversidade fúngica encontrada, dentre eles a disponibilidade de

fontes de nutrientes, fatores físico-químicos do ecossistema costeiro, interações entre os organismos que vivem naquele habitat, interferentes antropológicos da região, e as características genéticas e bioquímicas dos organismos (AL-RAJHI *et al.*, 2022), o que pode explicar a grande variabilidade quanto a quantidade e capacidade de cultivo dos microrganismos estudados. No trabalho de Al-Rajhi (2022) foram isolados 30 fungos pertencente a 12 espécies, já em Ezeonuegbu *et al.*, (2022), foram isolados 15 fungos pertencentes a 4 espécies.

A produção de metabólitos pelos fungos também é uma característica sujeita a influência de diversos fatores. O potencial inibitório dos fungos isolados neste trabalho foi inicialmente avaliado no *screening* preliminar (ou teste do plug de ágar), onde foi verificada a capacidade de inibição bacteriana diretamente a partir do micélio fúngico. Neste teste, diferenças em relação ao tempo de cultivo do fungo na inibição, foram verificadas apenas quando se tratou de *E. coli* (halos de inibição maiores em cultivos de 7 dias) e *C. albicans* (halos de inibição maiores em cultivos de 14 dias). Para os outros microrganismos testados não foi percebida diferença estatística em relação aos dias de cultivo, revelados pelo teste de Mann-Whitney.

A atividade antimicrobiana preliminar foi expressa pelo diâmetro da zona de inibição formada na área de contato entre o extrato e o crescimento das cepas padrão indicadoras. De um total de 24 fungos isolados a partir de diferentes macroalgas, 11 (45,8% dos isolados) exerceram atividade inibitória em um ou mais de um dos microrganismos padrão indicadores. Este percentual está dentro das médias encontradas na literatura, como se pode ver nos estudos de Kumar; Prasher, (2022), que atingiu uma porcentagem de 60% trabalhando com 25 isolados; o de Oliveira, de *et al.*, (2022), atingindo 53,3% a partir de 15 isolados, e Chua; Song; Ting, (2022) 13,56% partindo de 59 isolados.

Os diâmetros das zonas de inibição no presente trabalho variaram de 0 a 30mm. Compostos bioativos com diferentes mecanismos de ação, ou diferentes concentrações do mesmo composto produzido por fungos filamentosos, podem explicar a variação na ação antimicrobiana (OLIVEIRA, F. DE *et al.*, 2022). A maior zona de inibição foi registrada pelo isolado endofítico 14 contra a levedura *C. albicans*, com 30mm, seguido por 16 mm de halo em *S. aureus* e *E. faecalis* pelos isolados 4 e 1 respectivamente, também o isolado 4 causou uma zona de 11 mm em *E. coli*, e o isolado 17 causou uma zona de 10mm em *V. cholerae*. A amplitude dos halos de inibição varia bastante quando se analisa a literatura sobre o tema. Oliveira *et al.*, (2022) obteve uma variação de 10mm a 23mm, Chua; Song; Ting, (2022) obteve uma variação de 5,67 a 25mm, Farhat *et al.*, (2022) obteve inibição de 7 a 22mm. Em Wary *et*

al., (2022) o maior halo não atinge 20 mm contra nenhum dos isolados padrões analisados. Enquanto em Abouamama *et al.*, (2023) os tamanhos dos halos variaram entre 15 e 23cm. As zonas de inibição do presente trabalho, resultante apenas do contato do micélio fúngicos com as bactérias são comparáveis inclusive com resultados de extratos processados: Padhi *et al.*, (2019) obteve zonas entre 0 e 29 mm trabalhando com extratos acetoetanólicos de *Talaromyces sp.* Bhat *et al.*, (2023) obteve zonas de 8 a 24 mm trabalhando com frações do extrato *Talaromyces pinophilus*.

A detecção de zonas de inibição de crescimento a partir do *screening* da atividade antimicrobiana funciona como um indicativo do potencial inibitório dos isolados fúngicos (ORDOÑEZ-ENIREB, 2022). Estudos preliminares de inibição microbiana são de grande importância uma vez que evita procedimentos de extração sem o conhecimento prévio da habilidade do microrganismos em produzir ou não metabólitos com atividade inibitória (OLIVEIRA, *et al.*, 2022).

Foi percebido que contra as espécies *P. aeruginosa* e *S. enterica* os isolados testados não foram capazes de causar inibição. Resultados semelhantes foram encontrados por Padhi *et al.*, (2019) e Mishra *et al.*, (2022), onde em seus trabalhos de investigação de inibição de *Talaromyces sp.* contra bactérias, não foi detectado inibição em *P. aeruginosa* e *Salmonella sp.* respectivamente. Devido a capacidade cada vez maior dos microrganismos em resistir a presença de componentes inibitórios, tem se tornado comum ausência de inibição microbiana em certos casos. Em Zhang *et al.*, (2022), de 10 compostos testados nenhum teve atividade antimicrobiana e nem antioxidante. Em Azahar *et al.*, (2023) extratos fúngicos etanólicos e aquosos não foram capazes de inibir *E. coli*.

No caso da *P. aeruginosa*, essa ausência de inibição pode se dar devido a sua alta capacidade de produção de biofilme, que serve como um mecanismos de virulência, influencia no aumento da taxa de transferência horizontal de genes de resistência, além de proteger as células da exposição aos compostos inibitórios (BOWLER; MURPHY; WOLCOTT, 2020; SOUSA, DE *et al.*, 2023). Dados recentes tem mostrado que espécies de *Salmonella* possuem resistência simultânea a diversos compostos inibitórios. A expressão da resistência em *Salmonella sp.* pode acontecer por diferentes mecanismos de complexidade variada, em especial pela presença de enzimas que inativam componentes inibitórios através da modificação de seus grupos funcionais, mecanismos de *efflux pump*, e redução da permeabilidade a moléculas tóxicas (CHAUDHARI; SINGH; KODGIRE, 2023; WANG, Y. *et al.*, 2022).

O potencial inibitório constatado no *screening* preliminar foi utilizado na seleção de isolados que foram submetidos a produção dos extratos a partir de extrações líquido-líquido

utilizando acetato de etila. Os extratos produzidos apresentaram diversidade de tons, com colorações que variaram desde o amarelo pálido, amarelo, laranja, marrom opaco e verde brilhante. A presença de extratos com cores variadas é respaldada pelos achados de Oliveira, *et al.*, (2022), que verificaram a habilidade de espécies do gênero *Talaromyces sp.* em produzir diversos tipos de corantes naturais, alguns deles inclusive com atividade antimicrobiana. Muitos pigmentos tem importantes propriedades biológicas, dentre elas atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral e anticolesterolêmica, o que tem despertado uma atenção crescente por parte da indústria farmacêutica. O potencial para produção de corantes variados por espécies de *Talaromyces*, conhecidas por produzirem pigmentos intra e extracelular amarelo, laranja e vermelho é considerado de grande importância econômica e ecológica por representar uma alternativa aos corantes sintéticos de alta toxicidade (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Para produção dos extratos os fungos foram cultivados em ágar batata para isolamento, e depois passados para caldo batata para fermentação por 14 dias. Adelusi *et al.*, (2022) em seu trabalho de avaliação da variabilidade de metabólitos produzidos por *Talaromyces pinophilus* concluíram que entre diferentes meios comumente utilizados para o cultivo de fungos, os isolados que foram crescidos no meio ágar batata apresentaram o dobro da produção de compostos identificados, sendo considerado portanto um meio adequado para o cultivo de *Talaromyces sp.* em trabalhos de bioprospecção.

O solvente utilizado para as extrações dos compostos foi o acetato de etila, reportado por diferentes trabalhos como o mais adequado para bioativos fúngicos, devido a sua polaridade média, o que o torna adequado para interações com substâncias bioativas tanto polares quanto apolares (medianas), e além disso, sua toxicidade relativamente baixa (ABDULRAHMAN *et al.*, 2022;GAGANA; KUMARASWAMY; SHIVANNA, 2020;RODRIGUES *et al.*, 2020). A utilização de outros solventes com polaridades mais fortes favorece a extração de compostos mais polares podendo ser os responsáveis pela inibição micelial que não foi detectada nos extratos.

Os dez extratos produzidos foram utilizados nos testes de CIM, CBM e IC50. Assim como em outros trabalhos que avaliaram atividade antimicrobiana de extratos brutos, neste trabalho foram registradas diferentes níveis de inibição ao crescimento microbiológico. Alguns trabalhos encontram isolados fúngicos que apresentaram CIMs bem baixas como Al-Rajhi *et al.*, (2022) que obteve CIM de 21,62µg/mL para *E. coli*, 23.30 µg/mL para *S. aureus*, e 31,2 µg/mL para *C. albicans*. Enquanto Pretsch *et al.*, (2014) trabalhando com frações isoladas de extrato de *Talaromyces wortmannii* obteve uma CIM de 125 µg/mL frente a *E. coli*. Comparando-se com a menor CIM frente a *E. coli* obtido neste trabalho ($\leq 250\mu\text{g/mL}$), o de

Pretsch *et al.*, (2014) se mostra menor (maior inibição), porém, é necessário pontuar que no presente trabalho, foi utilizado o extrato bruto, e não frações isoladas. No próprio trabalho de Pretsch *et al.*, (2014) eles comparam o efeito do extrato bruto e dos compostos isolados, e atesta que a atividade antibacteriana foi significativamente melhorada quando se testou o composto purificado.

As CIM obtidas para *E. coli* utilizando extratos acetoetanólicos foram: $\leq 250 \mu\text{g/mL}$, $\leq 500 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 500 \mu\text{g/mL}$ pelos extratos E1, E4, e E16 respectivamente. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Rodrigues *et al.*, (2020) e Rodrigues *et al.*, (2022), que trabalhando com extratos acetoetanólicos de *Talaromyces islandicus* obtiveram CIM para *E. coli* de 1000 $\mu\text{g/mL}$, e 250 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Para *V. cholerae*, os valores de CIM obtidos foram: $\leq 125 \mu\text{g/mL}$, $\leq 250 \mu\text{g/mL}$, $\leq 250 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$, pelos extratos E1, E11, E15, e E17 respectivamente. Os resultados dos extratos E1, E11 e E15 se mostraram em congruência com os resultados de Mishra *et al.*, (2022), onde a CIM exercida por *Talaromyces* em *V. cholerae* foi de 256 $\mu\text{g/mL}$. No trabalho de Karim *et al.*, (2021), com extratos metanólicos de *Desmodium triflorum*, o valor de CIM obtido para *V. cholerae* foi bem mais alto: 2500 $\mu\text{g/mL}$. Huang *et al.*, (2022) com extrato fúngico acetoetanólico obteve CIM para *V. cholerae* ≤ 1000 , assim como a CIM obtida pelo extrato 17 do presente trabalho, e mais alto quando comparado com as CIMs obtidas pelos extratos 1, 11, e 15, que se mostraram dessa forma com maior potencial inibitório.

Quanto a atividade bactericida (CBM), no presente trabalho foi possível verificar a morte do microrganismos indicadores pela atividade extratos E1 e E4 de *Talaromyces sp* frente a *E. coli* a uma concentração de $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$. Indo de encontro com resultados de Rodrigues *et al.*, (2022), que trabalhando com extrato acetoetanólico de *Talaromyces islandicus* mostrou atividade bactericida na mesma concentração. Em relação a CBM contra *V. cholerae*, apenas o E1 foi capaz de exercer ação bactericida, em uma concentração de $\leq 250 \mu\text{g/mL}$. Comparando-se com outros autores, a atividade bactericida encontrada no presente estudo foi menor (mais inibitória). Santos Filho *et al.*, (2023) obtiveram uma CBM de 330 $\mu\text{g/mL}$ utilizando óleos essenciais contra *V. parahaemolyticus*, e Sun *et al.*, (2020) obtiveram CBM de 2500 $\mu\text{g/mL}$ trabalhando com extrato de mirtilo contra *V. parahaemolyticus*.

A avaliação das IC50 foi feita nos extratos que exerceram inibição estatisticamente significativa comprovada pela análise de regressão linear, que descreve o grau de relação entre as variáveis analisadas, neste caso, o percentual inibitório microbiano e a concentração do extrato. Em *E. coli* as IC50 foram registradas nos extratos 16, 4 e 1, com concentrações: 582,09 $\mu\text{g/mL}$, 714,77 $\mu\text{g/mL}$, e 936,5 respectivamente. O isolado 4 já tinha aparecido no *screening*

preliminar como o que causou maior halo em *E. coli*. Em *V. cholerae* as IC50 foram registradas para os extratos 1, 15, 11 e 17, com 119,01 µg/mL, 191,31 µg/mL, 249,59 µg/mL, e 626,87 µg/mL respectivamente. O isolado 17 se destacou desde o *screening* preliminar como o que causou maior halo em *V. cholerae*. A presença de algumas das mesmas fontes de produção dos extratos com o mesmo isolado que causou inibição no teste de *screening* evidencia a importância da filtragem de isolados por testes preliminares.

Os valores de IC50 do presente trabalho foram registrados para *E. coli* e *V. cholerae* (uma vez que para os outros microrganismos teste não foi identificado atividade inibitória estatisticamente significativa). Como a natureza e atividade do composto inibitório pode diferir grandemente de acordo com a espécie utilizada, características de cultivo, e microrganismo testado, há uma grande variação quanto aos resultados encontrados na literatura. Padhi *et al.*, (2019) obteve MIC contra *E. coli* com valores tão baixos quanto 25 µg/mL. Já Harikrishnan *et al.*, (2021) obteve resultados que seguiram tendências mais parecidas com o presente trabalho. A menor IC50 calculada em Harikrishnan *et al.*, (2021) foi de 458.7 µg/mL, e a maior de 793.2 µg/mL. Já nos extratos produzidos neste estudo, o menor IC50 foi 119,01 µg/mL contra *V. cholerae*, e o maior 936,5 µg/mL contra *E. coli*.

Com os resultados obtidos a partir deste trabalho, foi possível observar que a inibição estatisticamente significativa só foi verificada para as bactérias Gram negativas. Essa especificidade é vantajosa uma vez que a taxa de disseminação de resistência a antibióticos que afetam poucas espécies é bem menor quando comparada a antibióticos de amplo espectro. Antibióticos de amplo espectro tendem a induzir uma pressão seletiva abrangente intensificando a disseminação da resistência interpatogênica. Dessa forma, antibióticos de ação limitada e direcionados a grupos específicos, tem menor probabilidade de perturbar a ecologia da microbiota local durante o tratamento (LIU *et al.*, 2023).

Na avaliação da atividade contra *C. albicans* foi percebido zonas de inibição no *screening* preliminar, porém, nos testes utilizando os extratos fúngicos não houve inibição do crescimento fúngicos, o que corrobora com os resultados de Chua; Song; Ting, (2022) e Rodrigues *et al.*, (2022), onde seus extratos não exerceram atividade anticândida.

O aumento do nível de aquisição de multirresistências em microrganismos requerem a necessidade vital de antibióticos alternativos aos antibióticos atuais de amplo espectro contra patógenos clínicos. O fato de os extratos testados não terem causado inibição em alguns dos microrganismos indicadores não quer necessariamente dizer que estes extratos não tenham capacidade de inibi-los, mas que nas condições testadas, a inibição não foi verificada. Modificações no modo de cultivo podem alterar esses resultados. Estratégias como co-cultivo,

mudança nas condições de fermentação, alteração de períodos de luz, de pH e tipo de meio de cultivo podem induzir mudanças notáveis e desbloquear clusters gênicos de biossíntese no metaboloma microbiano (LAN; WU, 2020).

Morfologicamente, os fungos que exerceram atividade antimicrobiana se mostraram muito parecidos. Essa semelhança foi confirmada na identificação, que mostrou que todos pertenciam ao gênero *Talaromyces*, cujas espécies tem uma ampla distribuição geográfica, tendo sido isolados a partir do solo, de plantas, de esponjas marinhas (LAN; WU, 2020) e macroalgas (RAMYA; SETHUMADHAVAN; DEVIKA, 2023).

Apesar da semelhança com *Penicillium* sp., microscopicamente foi possível fazer a distinção, entre outros fatores, pela ausência da estrutura semelhante a um “pincel” que dá origem aos conídios de *Penicillium* sp (OLIVEIRA, 2014). No caso de *Talaromyces* sp. os conídios se agrupam em menor número sobre o conidióforo. A semelhança é esperada uma vez que estudos de caracterização molecular utilizando primer do RNA 18s identificou homologia de 98% entre *Talaromyces* sp e *Penicillium verruculosum* (SALYBEKOVA *et al.*, 2023).

Assim como em Hawas *et al.*, (2022), a identificação morfológica dos fungos foi feita pelo reconhecimento das características morfológicas do gênero e espécie através de exame macroscópica e microscópica. As características foram observadas por até 14 dias de incubação em meio ágar batata.

O aspecto da colônia no anverso e no reverso da placa, assim como suas características microscópicas foram analisadas para determinação do gênero *Talaromyces*: micélio pulverulento de cor verde com bordas brancas e presença de exudato oleoso e amarelado no anverso; reverso com cor castanho, e sem pigmento solúvel. Microscopicamente os fungos apresentaram hifas longas, septadas, hialinas, com conidióforos em biverticilados, com 3 a 6 fialides acerosas por métulas, e conídios unicelulares globosos ligeiramente elipsoides (CHRISTIANA; HIDEKI; JAMES, 2017).

Os extratos de *Talaromyces* com capacidade de inibição microbiana foram submetidos a análise da composição química a partir do UPLC acoplado a detectores de massas do tipo quadrupolo e de arranjo de diodos (UPLC-Q-Da). Fungos produzem uma variedade impressionante de moléculas orgânicas naturais, com muitos grupos funcionais únicos (LAN; WU, 2020). O gênero *Talaromyces* contém mais de 200 metabólitos secundários conhecidos, incluindo ésteres, terpenos, esteróides, alcalóides, policetídeos, antraquinonas, isocumarinas, macrolídeos, meroterpenóides. Alguns compostos têm atividades biológicas, como atividades anti-inflamatórias, bacteriostáticas e antitumorais, com destaque para atividade antibacteriana (CHEN *et al.*, 2023).

Foram identificados 21 picos nos espectrômetros de massas correspondentes a 21 compostos (alguns compostos se repetiram entre as amostras), sendo 5 sulfonas, 4 antraquinonas, 4 compostos aromáticos, 3 azafilonas, 2 isocumarinas, 2 esteróis e 1 cetona. Dentre essas classes, duas delas (azafilonas e antraquinonas) são conhecidas por ter entre seus representantes substâncias como corantes/pigmentos. Muitas espécies do gênero *Talaromyces* produzem grandes quantidades de pigmentos sem produzir nenhum tipo de micotoxina conhecida, evidenciando sua potencial aplicação nos diversos setores industriais (LAN; WU, 2020).

Os 21 espectros de massas foram identificados em 9 compostos diferentes. Destes, um dos compostos esteve presente em 5 dos 6 extratos que causaram inibição significativa: o pensulfonoxy. O pensulfonoxy foi identificado nos extratos que se mostraram como inibidores eficientes de *E. coli* (E1, E4 e E16) e de *V. cholerae* (E1, E11, e E16; exceto no E15). A presença do pensulfonoxy nos extratos inibitórios corrobora com os resultados de Hawas *et al.*, (2022), que isolaram o mesmo composto, porém a partir do fungo endofítico *P. aculeatum*, e constatou atividade inibitória em todos os microrganismos Gram-negativos testados (incluindo *E. coli*), e ausência de inibição em *S. aureus* e *C. albicans*, assim como o presente trabalho.

Outro composto que foi encontrado em mais de um extrato (E1, E4 e E17) foi a Purpurquinona A, uma azafilona (classe de corantes), que teve sua toxicidade testada no trabalho de Pandit *et al.*, (2020) e foi considerado não tóxico e seguro para uso em alimentos e nutracêuticos.

O Ergosta-5,7,9 (11), 22-tetraen-3 β -ol, da classe dos esteróis, foi identificado nos extratos E1 e E4. Mishra *et al.*, (2022) identificou em suas análises de docking molecular que este composto é capaz de se ligar em receptores para fator de crescimento epidermal (ligados a célula cancerígenas) e suprimir sua atividade, mostrando seu potencial como composto antiproliferativo.

A rugulosina A, da classe das antraquinonas, foi encontrada nos extratos E4 e E15. E o composto 8-dihydroxy-10-O-methyldendryol E, também da classe das antraquinonas foi encontrado apenas no extrato E17. Na literatura estes dois compostos foram reportados como tendo atividade contra *S. aureus* (LI *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2022) o que não foi visto no presente trabalho. Vários podem ter sido os motivos, inclusive presença de interferentes no extrato, uma vez que os testes foram feitos com o extrato bruto, e não com frações separadas.

A talaroisocumarina, da classe das isocumarinas, e a rugulosina D da classe das antraquinonas, foram identificadas apenas no extrato E4. Os dois compostos foram reportados por Ma *et al.*, (2021); e SONG *et al.*, (2022) respectivamente, exibindo atividade antimicrobiana

contra MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), *E. coli*, e *C. albicans*, no caso da talaroisocumarina, e contra *S. aureus*, *E. coli*, e *C. albicans* no caso da rugulosina D. A atividade contra *E. Coli* foi também verificada no presente estudo, porém sem atividade contra os outros microrganismos teste em comparação. Assim como já mencionado muitas variáveis que podem afetar essas atividades diversas.

O composto 4-Methyl-2-oxo-(1H)-pyrimidine, da classe dos compostos aromáticos foi identificado nos extratos E11 e E16. Há muito já se tem identificado que derivados do pirazol costumam apresentar intensa atividade anti-inflamatória através da inibição de prostaglandinas (*in vitro* e *in vivo*) (FAHMY *et al.*, 2012;HASSAN *et al.*, 2013).

O Abeopyrenulin, uma fenalenona da classe das cetonas, foi identificada apenas no extrato E11. Liang *et al.*, (2021) relatou a identificação do composto, e fez teste quanto ao potencial de inibição enzimática, porém, o composto em questão não mostrou inibição significativa.

O grupo de compostos de maior ocorrência relatada produzido por *Talaromyces pinophilus* foram os alcanos (ADELUSI *et al.*, 2022). No presente estudo, a maior ocorrência foi de sulfonas, porém deve-se destacar que não foram identificados todos os picos, de modo que alguns compostos não identificados podem alterar a proporção das classes obtidas. Além disso, dependendo da forma de cultivo do fungos, dos métodos utilizados na extração, os tipos dos compostos identificados e suas bioatividades podem variar em relação ao tipo e quantidade.

É importante ressaltar que devido a riqueza metabólica encontrada em fungos, e no gênero *Talaromyces*, os espectros que não tiveram identificação podem se referir a substâncias ainda não conhecidas, a investigação dessas substâncias representa um potencial imenso como fonte de novas substâncias bioativas (ADELUSI *et al.*, 2022;PADHI *et al.*, 2019;ZHAI *et al.*, 2016).

Quanto às substâncias identificadas, os mecanismos associados a inibição de patógenos microbiológicos podem estar ligados a inibição da síntese da parede celular, alterações na membrana plasmática, interferência nas funções mitocondriais, interferência na síntese de ácidos nucleicos e proteínas, e indução de estresse oxidativo. O mecanismo específico vai depender do tipo de metabólito e do seu local de ação (RODRIGUES *et al.*, 2020;VEGA-PORTALATINO *et al.*, 2023).

Pode-se supor que a produção de metabólitos com potencial biotecnológico por *Talaromyces* esteja ligada a clusters gênicos biossintéticos que já foram reportados em diferentes espécies do mesmo gênero. Análises genômicas de *T. ponophilus* revelaram que esta

espécies possui pelo menos 68 *clusters* gênicos, com capacidade de produção de metabólitos secundários (ADELUSI *et al.*, 2022).

Estudos de docking molecular são sugeridos com as substâncias identificadas, numa tentativa de identificação dos grupos participantes da interação substância-patógeno. A partir desse conhecimento é possível investigar formas de melhorar as interações e aumentar o potencial de ação.

Pensulfonoxony pode ter contribuído para a atividade antibacteriana exibida pelos extratos testados nesta pesquisa, uma vez que de acordo com estudos prévios, este composto possui atividade antimicrobiana intensa contra *E. coli*, (HAWAS *et al.*, 2022) que foi um dos microrganismos eficazmente inibidos pelos extratos ora testados.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho destaca a importância da bioprospecção em ambientes considerados reservatório de diversidade ainda pouco explorados, como é o caso do ambiente marinho. Algas marinhas apresentam uma rica diversidade de relações ecológicas, com diferentes microrganismos compondo sua microbiota (holobiontes). Fungos do gênero *Talaromyces sp.* se mostraram eficientes quanto a produção de bioativos diversos, dentre eles, compostos capazes de inibir microrganismos patogênicos.

Os extratos acetetanólicos E1, E4, E11, E15, E16, E17 de *Talaromyces sp* exerceram inibição significativa contra microrganismos Gram-negativos, e tiveram sua composição parcialmente elucidada. Dentre eles, o E1 foi o único capaz de inibir tanto *E. coli* quanto *V. cholerae*, neste último apresentando os menores índices inibitórios tanto para CIM, como para CBM e IC50, sendo dessa forma considerado o mais promissor do presente estudo.

Pesquisas mais aprofundadas na separação, quantificação e aplicação dos metabólitos encontrados neste estudo ainda são necessários. Porém, com os resultados já obtidos, foi possível identificar o pensulfonoxo como provável molécula responsável pela inibição. Estes achados contribuem para uma melhor compreensão de metabólitos produzidos por *Talaromyces* e suas formas de interação contra patógenos.

Uma perspectiva futura promissora é a utilização de tecnologias como a de modelagem por *docking* molecular para se avaliar a efetividade de interação dos compostos detectados com patógenos clínicos, e a partir daí promover modificações no design e na síntese para melhorar sua eficiência de inibição e possível produção de agentes antibacterianos.

As descobertas feitas até o momento ensejam a realização de novos estudos com vistas a aprofundar o entendimento sobre a interação dos simbioses com as macroalgas marinhas, a influência desta interação no tipo e quantidade de metabólitos produzidos, o papel dessas moléculas no ambiente, e as formas de interação dos compostos identificados com alvos moleculares nos microrganismos patogênicos indicadores. Espera-se que os esforços empreendidos contribuam para avanços nas pesquisas sobre a segurança e o potencial inibitório dos bioativos dos holobiontes de macroalgas marinhas.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M. A. *et al.* Isolation of endophytic fungi from South African plants, and screening for their antimicrobial and extracellular enzymatic activities and presence of type I polyketide synthases. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 134, p. 336–342, 2020. ISSN: 02546299, DOI: 10.1016/j.sajb.2020.03.021.
- ABDULRAHMAN, I. *et al.* Antibiofilm activity of secondary metabolites from bacterial endophytes of Red Sea soft corals. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s.l.], v. 173, n° July, p. 105462, 2022. ISSN: 09648305, DOI: 10.1016/j.ibiod.2022.105462.
- ABOUAMAMA, S. *et al.* Amylolytic and antibacterial activity of filamentous fungi isolated from the rhizosphere of different plants grown in the Tamanghasset region. **Heliyon**, [s.l.], v. 9, n° 3, p. e14350, 2023. ISSN: 24058440, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14350.
- ADELUSI, O. A. *et al.* Variability in metabolites produced by *Talaromyces pinophilus* SPJ22 cultured on different substrates. **Fungal Biology and Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 1–9, 2022. ISSN: 20543085, DOI: 10.1186/s40694-022-00145-8.
- AL-RAJHI, A. M. H. *et al.* Screening of Bioactive Compounds from Endophytic Marine-Derived Fungi in Saudi Arabia: Antimicrobial and Anticancer Potential. **Life**, [s.l.], v. 12, n° 8, 2022. ISSN: 20751729, DOI: 10.3390/life12081182.
- ANDERSSON, D. I. *et al.* Antibiotic resistance: Turning evolutionary principles into clinical reality. **FEMS Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 44, n° 2, p. 171–188, 2021. ISSN: 15746976, DOI: 10.1093/FEMSRE/FUAA001.
- ATTIQ, N. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Exploring the anti-SARS-CoV-2 main protease potential of FDA approved marine drugs using integrated machine learning templates as predictive tools. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 220, n° September, p. 1415–1428, 2022. ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.086.
- AZAHAR, N. I. *et al.* Evaluation of antioxidant, antibacterial and anticancer activities of *Ganoderma lucidum* extracts. **Materials Today: Proceedings**, [s.l.], n° May, 2023. ISSN: 22147853, DOI: 10.1016/j.matpr.2023.08.030.
- BHAT, M. P. *et al.* In-vitro investigation on the biological activities of squalene derived from the soil fungus *Talaromyces pinophilus*. **Heliyon**, [s.l.], v. 9, n° 11, p. e21461, 2023. ISSN: 24058440, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e21461.
- BOWLER, P.; MURPHY, C.; WOLCOTT, R. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 1–5, 2020. ISSN: 20472994, DOI: 10.1186/s13756-020-00830-6.
- CAI, J. *et al.* Three new bioactive natural products from the fungus *Talaromyces assiutensis* JTY2. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 94, n° October 2019, p. 103362, 2020. ISSN: 10902120, DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103362.

CHAUDHARI, R. *et al.* Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* spp. **Research in Microbiology**, [s.l.], v. 174, n° 1–2, p. 103985, 2023. ISSN: 17697123, DOI: 10.1016/j.resmic.2022.103985.

CHUA, R. W.; SONG, K. P.; TING, A. S. Y. Antimicrobial activities and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Cymbidium* and *Dendrobium* orchids. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 151, p. 909–918, 2022. ISSN: 02546299, DOI: 10.1016/j.sajb.2022.11.015.

CHEN, J. *et al.* *Talaromyces* sp. Ethyl Acetate Crude Extract as Potential Mosquitocide to Control *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Molecules**, [s.l.], v. 28, n° 18, 2023. ISBN: 8618379174, ISSN: 14203049, DOI: 10.3390/molecules28186642.

CHERNOV, V. M. *et al.* Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s.l.], v. 14, n° 5, p. 455–468, 2019. ISSN: 1746045X, DOI: 10.1080/17460441.2019.1588880.

CHRISTIANA, N. O. *et al.* Isolation and identification of *Talaromyces purpurogenus* and preliminary studies on its pigment production potentials in solid state cultures. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 16, n° 13, p. 672–682, 2017. DOI: 10.5897/ajb2016.15798.

CHUA, R. W. *et al.* Antimicrobial activities and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Cymbidium* and *Dendrobium* orchids. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 151, p. 909–918, 2022. ISSN: 02546299, DOI: 10.1016/j.sajb.2022.11.015.

CLSI. **M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 31th ed. 2021. ISBN: 9781684401048.

DAVID, S. R.; BAHARULNIZAM, N. B.; RAJABALAYA, R. Review article A review on biological assays of red algae marine compounds : An insight into skin whitening activities. **Journal of Herbal Medicine**, [s.l.], v. 35, n° June 2022, p. 100585, 2022. ISSN: 2210-8033, DOI: 10.1016/j.hermed.2022.100585.

DEMARCO, M. *et al.* Digestibility , bioaccessibility and bioactivity of compounds from algae. **Trends in Food Science & Technology** [s.l.], v. 121, n° October 2021, p. 114–128, 2022. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.02.004.

DENG, Y. *et al.* Marine natural products and their synthetic analogs as promising antibiofilm agents for antibiotics discovery and development. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 239, n° March, p. 114513, 2022. ISSN: 17683254, DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114513.

DESHMUKH, S. K.; *et al* Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, n° JAN, p. 1–24, 2018. ISSN: 1664302X, DOI: 10.3389/fmicb.2017.02536.

DEVI, R. *et al.* Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and**

Bioengineering, [s.l.]: Elsevier Inc., 2020. 147–161 p. ISBN: 9780128205280, DOI: 10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7.

EL-BONDKLY, *et al.* Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration. **Heliyon**, [s.l.], v. 7, n° 3, p. e06362, 2021. ISSN: 24058440, DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06362.

EZEONUEGBU, B. A. *et al.* Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 1–11, 2022. ISBN: 0123456789, ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/s41598-022-05820-9.

FAHMY, H. H. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory evaluation of new substituted 1-(3-chlorophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazole derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, [s.l.], v. 69, n° 3, p. 411–421, 2012. ISSN: 00016837.

FARHAT, H. *et al.* Evaluation of antibacterial potential of endophytic fungi and GC-MS profiling of metabolites from *Talaromyces trachyspermus*. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 150, p. 240–247, 2022. ISSN: 02546299, DOI: 10.1016/j.sajb.2022.07.004.

FIGUERAS, M. . *et al.* **The Ultimate benchtool for diagnostic**. *Atlas of clinical fungi*, [s.l.], 2014.

FILHO, L. G. A. D. S. *et al.* Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia organoides*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [s.l.], v. 95, n° 1, p. 1–13, 2023. ISSN: 16782690, DOI: 10.1590/0001-3765202320220359.

GAGANA, S. L.; *et al.* Diversity, antibacterial and antioxidant activities of the fungal endophytes associated with *Schleichera oleosa* (Lour.) Merr. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 134, p. 369–381, 2020. ISSN: 02546299, DOI: 10.1016/j.sajb.2020.06.012.

GIDDINGS, L; NEWMAN, J.D. Extremophilic Fungi from Marine Environments: Underexplored Sources of Antitumor, Anti-Infective and Other Biologically Active Agents. **Marine drugs**, [s.l.], v. 20, n°62, 2022, DOI: 10.3390/md20010062

GUPTA, A.; *et al.* Marine bioactives : from energy to nutrition. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 40, n° 3, p. 271–280, 2021. ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/j.tibtech.2021.08.004.

HANDAYANI, D. *et al.* Antimicrobial activity screening of endophytic fungi extracts isolated from brown algae *Padina* sp. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], v. 9, n° 3, p. 9–13, 2019. ISSN: 22313354, DOI: 10.7324/JAPS.2019.90302.

HARIKRISHNAN, M. *et al.* Multi-functional bioactive secondary metabolites derived from endophytic fungi of marine algal origin. **Current Research in Microbial Sciences**, [s.l.], v. 2, n° May, p. 100037, 2021

HASSAN, N. M. *et al.* Efficacy of a pyrimidine derivative to control spot disease on *Solanum melongena* caused by *Alternaria alternata*. **Journal of Advanced Research**, [s.l.], v. 4, n° 4, p. 393–401, 2013. ISSN: 20901232, DOI: 10.1016/j.jare.2012.07.008.

HAWAS, U. W. *et al.* Bioactive sulfonyl metabolites from the Red Sea endophytic fungus

Penicillium aculeatum. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 36, n° 11, p. 2713–2721, 2022. ISSN: 14786427, DOI: 10.1080/14786419.2021.1917571.

HERNANDO-AMADO, S. *et al.* Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, [s.l.], v. 4, n° 9, p. 1432–1442, 2019. ISSN: 20585276, DOI: 10.1038/s41564-019-0503-9.

HUANG, B. *et al.* Isolation, Screening, and Active Metabolites Identification of Anti-Vibrio Fungal Strains Derived From the Beibu Gulf Coral. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 13, n° June, 2022. ISSN: 1664302X, DOI: 10.3389/fmicb.2022.930981.

JAYATILAKE, P. L.; MUNASINGHE, H. Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic and Rhizosphere Fungi Associated with “mile-a-Minute,” Mikania cordata (Asteraceae). **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2020, 2020. ISSN: 23146141, DOI: 10.1155/2020/5292571.

KAMAT, S. *et al.* Endophytic Fungi of Marine Alga From Konkan Coast, India—A Rich Source of Bioactive Material. **Frontiers in Marine Science**, [s.l.], v. 7, n° February, 2020. ISSN: 22967745, DOI: 10.3389/fmars.2020.00031.

KARIM, R. *et al.* In-vitro cytotoxic and anti-Vibrio cholerae activities of alcoholic extracts of Desmodium triflorum (L.) whole plant and Terminalia citrina (Roxb.) fruits. **Clinical Phytoscience**, [s.l.], v. 7, n° 1, 2021. DOI: 10.1186/s40816-021-00272-6.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism : regulation , function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 17, n° March, 2019. ISSN: 1740-1534, DOI: 10.1038/s41579-018-0121-1.

KUMAR, V.; PRASHER, I. B. Antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from Dillenia indica L. and identification of bioactive molecules produced by Fomitopsis meliae (Undrew.) Murril. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 36, n° 23, p. 6064–6068, 2022. ISSN: 14786427, DOI: 10.1080/14786419.2022.2043855.

KUMARI, M. *et al.* Antiproliferative and antioxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus Talaromyces purpureogenus. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 9, n° AUG, p. 1–12, 2018. ISSN: 1664302X, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01777.

LAI, C. K. C. *et al.* Overcoming the rising incidence and evolving mechanisms of antibiotic resistance by novel drug delivery approaches – An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 181, p. 114078, 2022. ISSN: 18728294, DOI: 10.1016/j.addr.2021.114078.

LAN, D.; WU, B. Chemistry and Bioactivities of Secondary Metabolites from the Genus Talaromyces. **Chemistry and Biodiversity**, [s.l.], v. 17, n° 8, 2020. ISSN: 16121880, DOI: 10.1002/cbdv.202000229.

LI, H. L. *et al.* Antioxidant hydroanthraquinones from the marine algal-derived endophytic fungus talaromyces islandicus EN-501. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 80, n° 1, p. 162–168, 2017. ISSN: 15206025, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00797.

LIANG, X. *et al.* Talaromyxaones A and B: Unusual Oxaphenalenone Spirolactones as

Phosphatase Inhibitors from the Marine-Derived Fungus *Talaromyces purpureogenus* SCSIO 41517. **Journal of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 86, n° 18, p. 12831–12839, 2021. ISSN: 15206904, DOI: 10.1021/acs.joc.1c01452.

LIU, G. *et al.* Deep learning-guided discovery of an antibiotic targeting *Acinetobacter baumannii*. **Nature Chemical Biology**, [s.l.], v. 19, n° 11, p. 1342–1350, 2023. ISSN: 15524469, DOI: 10.1038/s41589-023-01349-8.

LOOS, L. M. VAN DER; ERIKSSON, B. K.; FALCÃO SALLES, J. The Macroalgal Holobiont in a Changing Sea. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 27, n° 7, p. 635–650, 2019. ISSN: 18784380, DOI: 10.1016/j.tim.2019.03.002.

MA, M. *et al.* Talaromydien a and talaroisocoumarin A, new metabolites from the marine-sourced fungus *Talaromyces* sp. ZZ1616. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 36, n° 1, p. 460–465, 2021. ISSN: 14786427, DOI: 10.1080/14786419.2020.1779265.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, [s.l.], v. 6, n° 2, p. 1–26, 2018. ISSN: 2165-0497, DOI: 10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017.

MISHRA, V. *et al.* Elemental Analysis, Phytochemical Screening and Evaluation of Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Activity of *Pleurotus ostreatus* through In Vitro and In Silico Approaches. **Metabolites**, [s.l.], v. 12, n° 9, 2022. ISSN: 22181989, DOI: 10.3390/metabo12090821.

MOHAMED, H. *et al.* Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Deep learning strategies for active secondary metabolites biosynthesis from fungi : Harnessing artificial manipulation and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 38, n° October, p. 102195, 2021. ISSN: 1878-8181, DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102195.

NASSAR, C. **Macroalgas marinhas do Brasil - Guia de campo das principais espécies**. 1ª ed. [s.l.]: Technical Books. 2012.

NICOLETTI, R.; BELLAVITA, R.; FALANGA, A. The Outstanding Chemodiversity of Marine-Derived *Talaromyces*. **Biomolecules**, [s.l.], v. 13, n° 7, 2023. ISSN: 2218273X, DOI: 10.3390/biom13071021.

OLIVEIRA, F. DE *et al.* Identification of azaphilone derivatives of *Monascus* colorants from *Talaromyces amestolkiae* and their halochromic properties. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 372, n° May 2021, 2022. ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131214.

OLIVEIRA, J. C. De. **Diagnóstico Micológico por Imagens**. 1ª ed. [s.l.]: Control-Lab. 2014.

OLIVEIRA, V. B. De *et al.* Antimicrobial potential of filamentous fungi growing on renewable substrates. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 11, n° 11, p. e570111133958, 2022. ISBN: 0000000205, DOI: 10.33448/rsd-v11i11.33958.

ORDOÑEZ-ENIREB, E. *et al.* Antarctic fungi with antibiotic potential isolated from Fort William Point, Antarctica. **Scientific Reports** [s.l.], v. 12 p. 21477, 2022.

- PADHI, S. *et al.* Funiculosone, a substituted dihydroxanthene-1,9-dione with two of its analogues produced by an endolichenic fungus *Talaromyces funiculosus* and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 157, n° November 2018, p. 175–183, 2019. ISSN: 00319422, DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.10.031.
- PANDIT, S. G. *et al.* Safety efficacy and chemical profiling of water-soluble *Talaromyces purpureogenus* CFRM02 pigment. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 310, n° June 2019, 2020. ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125869.
- PAPON, N.; COPP, B. R.; COURDAVAULT, V. Marine drugs : Biology , pipelines , current and future prospects for production. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 54, n° November 2021, p. 107871, 2022. ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107871.
- PARTHASARATHY, R. *et al.* Molecular pro fi ling of marine endophytic fungi from green algae : Assessment of antibacterial and anticancer activities. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 96, n° May, p. 11–20, 2020. ISSN: 1359-5113, DOI: 10.1016/j.procbio.2020.05.012.
- PRETSCH, A. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activities of endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* extracts against acne-inducing bacteria. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n° 6, 2014. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0097929.
- RAMYA, A. K.; SETHUMADHAVAN, K.; DEVIKA, R. Biodiversity Of Endophytic Fungi from Marine Algae and Its Phylogenetic Studies. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, [s.l.], v. 10, n° 1, p. 241–251, 2023. ISSN: 2368-7487.
- RODRIGUES, I. V. P. *et al.* Biosynthesis and chemical characterization of an intracellular red pigment of *Talaromyces islandicus* T101. **bioRxiv**, [s.l.], 2020. ISSN: 26928205.
- RODRIGUES, I.V.P *et al.* In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of *Talaromyces islandicus* T101 from a polluted environment. **International Journal of Biological and Natural Sciences**, [s.l.], v. 2, n° 7, p. 2–14, 2022. ISBN: 3551894590, DOI: 10.22533/at.ed.813272220108.
- SALYBEKOVA, N. N. *et al.* PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF THE GENUS *PENICILLIUM* SP. ON TULIPS. **Microbiology and virology**, [s.l.], v. 4, n° 4(43), p. 234–251, 2023. ISSN: 2304585X, DOI: 10.53729/mv-as.2023.04.14.
- SONG, F. *et al.* New Antibacterial Secondary Metabolites from a Marine-Derived *Talaromyces* sp. Strain BTBU20213036. **Antibiotics**, [s.l.], v. 11, n° 2, p. 1–9, 2022. ISSN: 20796382, DOI: 10.3390/antibiotics11020222.
- SANTOS, L. S. *et al.* Chemotaxonomic evaluation of different species from the Myrtaceae family by UPLC-qToF/MS-MS coupled to supervised classification based on genus. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.l.], v. 90, n° March, p. 104028, 2020. ISSN: 03051978, DOI: 10.1016/j.bse.2020.104028.
- SATHIYASEELAN, A. *et al.* Antibacterial activity of ethyl acetate extract of endophytic fungus (*Paraconiothyrium brasiliense*) through targeting dihydropteroate synthase (DHPS).

Process Biochemistry, [s.l.], v. 111, n° P2, p. 27–35, 2021. ISSN: 13595113, DOI: 10.1016/j.procbio.2021.10.010.

SCHNEIDER, T. The holobiont self: understanding immunity in context. **History and Philosophy of the Life Sciences**, [s.l.], v. 43, n° 3, p. 1–23, 2021. ISBN: 0123456789, ISSN: 17426316, DOI: 10.1007/s40656-021-00454-y.

SEPULVEDA, B. *et al.* Green ultrasound-assisted extraction of lichen substances from *Hypotrachyna cirrhata*. Ethyl lactate, a better extracting agent than methanol toxic organic solvent? **Natural Product Research**, [s.l.], v. 0, n° 0, p. 1–5, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1956922.

SHAKOUR, Z. T.; FARAG, M. A. Diverse host-associated fungal systems as a dynamic source of novel bioactive anthraquinones in drug discovery: Current status and future perspectives. **Journal of Advanced Research**, [s.l.], v. 39, p. 257–273, 2022. ISSN: 20901232, DOI: 10.1016/j.jare.2021.11.007.

SHANKAR, Pr. **Book review: Tackling drug-resistant infections globally**. *Archives of Pharmacy Practice*, [s.l.], v. 7, n° 3, p. 110, 2016. ISSN: 2045-080X, DOI: 10.4103/2045-080x.186181.

SHEVKAR, C. *et al.* Cytotoxic Bioanthracene and Macrocyclic Polyester from Endolichenic Fungus *Talaromyces pinophilus*: In-Vitro and In-Silico Analysis. **Indian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 62, n° 2, p. 204–214, 2022. ISBN: 1208802100, ISSN: 09737715, DOI: 10.1007/s12088-021-00994-8.

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**, [s.l.], v. 11, n° 11, 2022. ISSN: 20796382, DOI: 10.3390/antibiotics11111509.

ŚLUSARCZYK, J.; ADAMSKA, E.; CZERWIK-MARCINKOWSKA, J. Fungi and algae as sources of medicinal and other biologically active compounds: A review. **Nutrients**, [s.l.], v. 13, n° 9, p. 1–24, 2021. ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu13093178.

SONG, F. *et al.* New Antibacterial Secondary Metabolites from a Marine-Derived *Talaromyces* sp. Strain BTBU20213036. **Antibiotics**, [s.l.], v. 11, n° 2, p. 1–9, 2022. ISSN: 20796382, DOI: 10.3390/antibiotics11020222.

SOUSA, T. DE *et al.* Study of Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Motility of *Pseudomonas aeruginosa* Derived from Urine Samples. **Microorganisms**, [s.l.], v. 11, n° 5, 2023. ISSN: 20762607, DOI: 10.3390/microorganisms11051345.

SUN, X. *et al.* Antimicrobial effects and membrane damage mechanism of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extract against *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Control**, [s.l.], v. 111, n° November 2019, p. 107020, 2020. ISSN: 09567135, DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.107020.

TECHAOEI, S. *et al.* Chemical evaluation and antibacterial activity of novel bioactive compounds from endophytic fungi in *Nelumbo nucifera*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 27, n° 11, p. 2883–2889, 2020. ISSN: 1319562X, DOI:

10.1016/j.sjbs.2020.08.037.

VEGA-PORTALATINO, E. J. *et al.* Antimicrobial and production of hydrolytic enzymes potentials of bacteria and fungi associated with macroalgae and their applications: a review. **Frontiers in Marine Science**, [s.l.], v. 10, n° May, p. 1–15, 2023. ISSN: 22967745, DOI: 10.3389/fmars.2023.1174569.

VITALE, G. A. *et al.* Antioxidant molecules from marine fungi: Methodologies and perspectives. **Antioxidants**, [s.l.], v. 9, n° 12, p. 1–35, 2020. ISSN: 20763921, DOI: 10.3390/antiox9121183.

WANG, Q. M. *et al.* Talaromyces neofusisporus and T. qii, two new species of section Talaromyces isolated from plant leaves in Tibet, China. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n° April 2015, p. 1–9, 2016. ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/srep18622.

WANG, Y. *et al.* Research progress on antibiotic resistance of Salmonella. **Food Quality and Safety**, [s.l.], v. 6, n° January, p. 1–10, 2022. ISSN: 23991402, DOI: 10.1093/fqsafe/fyac035.

WARY, S. *et al.* Leaf endophytic fungi of Cymbidium aloifolium L. produces antimicrobials and indole-3-acetic acid. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 149, p. 381–388, 2022. ISSN: 02546299, DOI: 10.1016/j.sajb.2022.06.035.

WHO. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data**. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023. Cataloguing-in-Publication (CIP). Disponível em: <http://apps.who.int/iris>. ISBN: 9789294986191.

WIPO. **Patentoscope Patent Search**: Fungal extract. 2024. Disponível em: https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf?_vid=P22-LTQ63I-42101. Acesso em: 01 mar. 2024.

YILMAZ, N. *et al.* Polyphasic taxonomy of the genus Talaromyces. **Studies in Mycology**, [s.l.], v. 78, n° 1, p. 175–341, 2014. ISSN: 01660616, DOI: 10.1016/j.simyco.2014.08.001.

ZAMMUTO, V. *et al.* In vitro evaluation of antibiofilm activity of crude extracts from macroalgae against pathogens relevant in aquaculture. **Aquaculture**, [s.l.], v. 549, n° November 2021, 2022. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737729.

ZHAI, M. M. *et al.* The Bioactive Secondary Metabolites from Talaromyces species. **Natural Products and Bioprospecting**, [s.l.], v. 6, n° 1, p. 1–24, 2016. ISBN: 1365901500813, ISSN: 21922209, DOI: 10.1007/s13659-015-0081-3.

ZHANG, K. *et al.* New Secondary Metabolites from the Marine-Derived Fungus Talaromyces mangshanicus BTBU20211089. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 20, n° 2, p. 2–12, 2022. ISSN: 16603397, DOI: 10.3390/md20020079.