



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

**GRACIELE SILVA SANTANA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Jatropha curcas***

**SUMÉ - PB  
2024**

**GRACIELE SILVA SANTANA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Jatropha curcas***

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

**Orientador: Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.**

**SUMÉ - PB**

**2024**



S232a Santana, Graciele Silva.

Avaliação das atividades antibacterianas de metabólitos secundários de fungos endofíticos da *Jatropha curcas*. / Graciele Silva Santana. - 2024.

55 f.

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz.

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

1. Atividade antibacteriana. 2. Metabólitos secundários. 3. Fungos endofíticos. 4. *Jatropha curcas*. 5. Biotecnologia. 6. Biomoléculas. 7. Bioprospecção. 8. Resazurina. 9. Pinhão manso. I. Queiroz, Jean César Farias de. II. Título.

CDU: 60 (043.1)

**Elaboração da Ficha Catalográfica:**

Johnny Rodrigues Barbosa  
Bibliotecário-Documentalista  
CRB-15/626

**GRACIELE SILVA SANTANA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Jatropha curcas***

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

**BANCA EXAMINADORA:**

---

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

---

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

---

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

**Trabalho aprovado em: 25 de outubro de 2024.**

**SUMÉ - PB**

Dedico este trabalho aos meus pais, Bernardino e Maria das Graças, pelo amor incondicional, pela confiança depositada e por estar ao meu lado em cada desafio e conquista. Sem o apoio a compreensão e o encorajamento de vocês, este momento não seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, com toda sua bondade, por me sustentar até aqui, me dando forças e sabedoria durante toda minha trajetória, por me proteger e guiar a cada desafio a ser superado.

Aos meus amados pais, Maria das Graças e Bernadino Santana pelo apoio incondicional, dedicação e por serem o maior incentivo para que eu alcançasse este objetivo. Vocês fizeram toda a diferença em minha vida com a educação, amor e cuidado que me proporcionaram. São os maiores motivos de todo o meu empenho.

Ao meu namorado e companheiro, Jardiel Barbosa, pelo apoio, compreensão, confiança e por estar presente durante essa fase tão importante. Agradeço, também, por muitas vezes me escutar, por me tranquilizar em diversos momentos e por não soltar minha mão.

Aos meus irmãos, Eronilson Santana e Graciene Santana, por todo apoio durante essa jornada, pelo carinho e por torcerem pelo meu crescimento. Agradeço em especial à minha irmã por todas as orações, louvores e palavras de conforto.

À minha sobrinha, Ayzha Eloá, por fazer minha vida mais leve com todas as chamadas de vídeo e por ser a luz que irradia nossas vidas.

Aos meus tios, Jaílton de Souza e Nailde Ferreira, por todo o apoio e incentivo desde o início da minha graduação até o final. O carinho, respeito e consideração que tenho por vocês são imensuráveis. Obrigada por todo o suporte, sou grata a Deus por ter me presenteado com uma segunda família.

À minha amiga, irmã e companheira de casa e laboratório, Danielle Ferreira, que faz parte da minha história há dez anos. Obrigada por ter me abraçado e segurado minha mão em tantos momentos difíceis, por sempre me incentivar e acreditar que eu iria além, por vibrar com cada conquista e cada barreira superada. Você me mostrou o quanto eu poderia superar meus medos e desafios ao longo dessa caminhada. Sou grata por todos os ensinamentos, por ter iniciado essa jornada ao seu lado, e por toda ajuda para realização do presente trabalho.

Aos meus professores da graduação por todos os ensinamentos que contribuíram para a minha formação e no meu desenvolvimento profissional. Em especial ao prof. Dr. Bruno Nunes, por se manter a disposição quando precisei.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Jean Queiroz, e orientador do estágio supervisionado, a quem tenho grande carinho, respeito e admiração, por todas as oportunidades, ensinamentos e orientações, cuidado, amizade, momentos de descontração e por toda paciência e contribuições durante a elaboração deste trabalho.

À minha amiga e irmã, Jéssica Freitas, sou extremamente grata por compartilhar o lar, todo o carinho, cuidado, apoio e disposição. Em momentos de dificuldade durante os experimentos deste trabalho, você esteve firme ao meu lado, ajudando e torcendo para que tudo desse certo, me direcionando a encontrar força em Deus e apresentando músicas, como 'Confiança', do Projeto Sola, que trouxeram paz e serenidade nos momentos de desânimo. Agradeço por me fazer sentir tão bem acolhida.

Ao professor Daniel Moura, orientador da Monitoria de Gestão da Qualidade, pela valiosa experiência e por contribuir no meu crescimento profissional.

Ao técnico Adriano Marques pelo suporte e auxílio no laboratório e aos terceirizados que, de alguma forma, ajudaram na construção do meu trabalho de conclusão.

À minha amiga Elayane Medeiros, por ter feito parte dessa jornada, por todo o carinho e amizade ao longo do caminho.

Aos amigos Anderson Rodrigues e Pedro Florêncio por todo o carinho, preocupação, cuidado e disposição nas horas de precisão.

Aos egressos Andreza Larissa e Pedro Victor por ter feito parte da minha trajetória com bons momentos partilhados. Reforço meu agradecimento a Andreza pelo valioso conhecimento transmitido nas disciplinas de cálculo.

Aos colegas e amigos da graduação, Antenor Linhares, Alisson Clementino, Anderson Rodrigues, Otto Kevin, Damares Silva e Vinícius Azevedo, por toda ajuda e momentos compartilhados durante a graduação. Em especial a Damares Silva pela atenção e ajuda nesta reta final do curso e do presente trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, Larisse Gabriela, pela força, e Yasmin Nascimento, pelo apoio nos momentos em que precisei.

Aos meus amigos, Roberta Farias e Renan Oliveira pelo carinho, amizade e momentos compartilhados. Vocês fizeram meus dias mais alegres.

Aos meus adoráveis baianos que fizeram parte desta jornada, Danielle Ferreira, Jéssica Freitas e Osmar Junior, por todos os momentos de diversões e parcerias.

Aos meus amigos, Daniela Carvalho e Luiz Neto pelos conselhos e apoio direcionado em muitos momentos da minha vida, por me ouvirem e torcerem pelo meu crescimento pessoal e profissional. Em especial à Daniela, por me acompanhar de perto ao longo de toda a minha trajetória até aqui, sempre presente, me incentivando e acreditando no meu potencial.

Aos amigos da Igreja, Paulo de Lima, Maria do Socorro e Rafael Lima por todo o carinho e momentos felizes compartilhados. Vocês são especiais.

À Adriana Correia por me receber em sua casa e por todo o suporte durante o estágio, pela recepção, carinho, momentos de descontração e risadas. Agradeço também a Francisco Arthur pelos momentos de lazer montando quebra-cabeça.

Aos amigos de estágio supervisionado, Crislayne Soares, Iara Monique, Verônica Leal, Ronald Peixoto, Paula Ribeiro e Viviane Lima, por todo o acolhimento, carinho e ensinamentos que me passaram. Em especial, agradeço à Verônica Leal, Iara Monique e Ronald Peixoto por tudo, conversas, risadas e momentos de confraternização. Vocês me abraçaram e tornaram meus dias melhores durante o estágio.

Às pessoas não mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para a minha evolução pessoal e profissional.

Meu muito obrigada!



Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.

Provérbios 16:3

## RESUMO

Atualmente, o mundo enfrenta uma grave crise de resistência aos antibióticos, com muitas das drogas usadas no tratamento de infecções, desenvolvidas há décadas, mostrando-se ineficazes contra superbactérias. Diante dessa problemática, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos torna-se essencial. Os fungos endofíticos associados à planta *Jatropha curcas* têm se revelado uma fonte promissora de substâncias bioativas, representando potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes no combate a cepas bacterianas resistentes. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo produzir e avaliar a atividade antibacteriana dos metabólitos secundários dos endófitos isolados da *Jatropha curcas* sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*. A avaliação da atividade antibacteriana foi conduzida utilizando o método de diluição em caldo, realizado em microplacas de 96 poços. A leitura dos dados foi realizada após a adição de resazurina a 0,01%, sendo analisados por meio do software ImageJ com o auxílio do plugin ReadPlate 3.0. Os dados amostrais foram submetidos à análise estatística por meio de ANOVA, seguida do teste de Tukey para verificar a significância das diferenças. Os resultados indicaram que os extratos Jc017, Jc27, Jc041, Jc047, Jc048 e Jc061 apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*, com Jc017, Jc041, Jc047, Jc048 e Jc061 exibindo maior eficácia em relação ao controle positivo com 100 mg/mL de amoxicilina. Para *S. epidermidis*, os extratos Jc041, Jc047 e Jc061 também demonstraram atividade superior em comparação ao controle positivo na mesma concentração. Os fungos Jc041, Jc047 e Jc061 destacaram-se por apresentarem o maior potencial com atividade antibacteriana entre os testados para as duas cepas de bactérias utilizadas. Portanto, os extratos dos fungos endofíticos isolados da *Jatropha curcas* demonstram potencial de biomoléculas promissoras para a produção de novos antibióticos de amplo espectro.

**Palavras-chaves:** Biotecnologia. Bioprospecção. Endófitos. Biomoléculas. Resazurina. Amplo espectro.

## ABSTRACT

The world is currently facing a serious crisis of antibiotic resistance, with many of the drugs used to treat infections, developed decades ago, proving ineffective against superbugs. Faced with this problem, research into new antimicrobial agents is becoming essential. Endophytic fungi associated with the *Jatropha curcas* plant have proved to be a promising source of bioactive substances, representing potential candidates for the development of new drugs that are effective in combating resistant bacterial strains. The aim of this study was to produce and evaluate the antibacterial activity of the secondary metabolites of the endophytes isolated from *Jatropha curcas* on the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. The evaluation of antibacterial activity was carried out using the broth dilution method in 96-well microplates. The data was read after the addition of 0.01% resazurin and analyzed using ImageJ software with the support of the ReadPlate 3.0 plugin. The sample data was subjected to statistical analysis using ANOVA, followed by Tukey's test to check the significance of the differences. The results indicated that the extracts Jc017, Jc27, Jc041, Jc047, Jc048 and Jc061 showed antibacterial activity against *E. coli*, with Jc017, Jc041, Jc047, Jc048 and Jc061 showing greater efficacy compared to the positive control with 100 mg/mL amoxicillin. For *S. epidermidis*, the extracts Jc041, Jc047 and Jc061 also showed superior activity compared to the positive control at the same concentration. Fungi Jc041, Jc047 and Jc061 stood out as having the greatest potential for antibacterial activity among those tested for the two strains of bacteria used. Therefore, the extracts of endophytic fungi isolated from *Jatropha curcas* show potential as promising biomolecules for the production of new broad-spectrum antibiotics.

**Keywords:** Biotechnology. Bioprospecting. Endophytes. Biomolecules. Resazurin. Broad spectrum.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Plantas da espécie <i>Jatropha curcas</i> no local de coleta, situado no CDSA..	<b>25</b>
<b>Figura 2</b> - Placa de Petri com partes dos galhos da <i>Jatropha curcas</i> em meio Batata-Sacarose- Agar (BSA).....	<b>26</b>
<b>Figura 3</b> - Migração dos fungos presentes nos tecidos internos dos galhos da <i>Jatropha curcas</i> para o meio de cultura BSA.....	<b>27</b>
<b>Figura 4</b> - Crescimento dos isolados fúngicos no meio de aveia, incubados a 37 °C, em recipientes de 40 mL.....	<b>28</b>
<b>Figura 5</b> - Esquema da placa 1 e 2 de 96 poços para o teste de atividade antibacteriana dos extratos fúngicos. A imagem representa o desenho das duas microplacas de 96 poços utilizada no teste de atividade antibacteriana de microrganismos dos extratos fúngicos por microdiluição. Para a placa 1, as linhas A e B (poços 1 a 3) correspondem aos controles negativos, indicados pelos poços coloridos em rosa e as linhas C, D, E e F (poços 1 a 3) em azul, correspondem os controles positivos, onde foram adicionados amoxicilina com diluição seriada. Os poços de 4 a 12 (linhas A a H) contêm os extratos fúngicos testados, sendo cada número preenchido no poço, indica a numeração dos extratos fúngicos na ordem. Para a placa 2, os poços de 1 a 6 (linhas A a H) contêm as amostras dos extratos fúngicos, com os números dentro dos poços representando o número de identificação dos extratos testados.....	<b>31</b>
<b>Figura 6</b> - Placas de Petri contendo colônias puras de fungos endófitos isolados da <i>Jatropha curcas</i> com diferentes fenótipos e características morfológicas.....	<b>36</b>
<b>Figura 7</b> - Cultivo de um dos fungos em meio de aveia após 7 dias de incubação.....	<b>38</b>
<b>Figura 8</b> - Imagem das microplacas após a reação da resazurina, evidenciando as mudanças de cor.....	<b>39</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc001 até Jc050 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli*. As barras indicam a média de absorvância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustentados indicam a significância estatística #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$ , em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL..... 42
- Gráfico 2 -** Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc051 até Jc101 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli*. As barras indicam a média de absorvância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustentados indicam a significância estatística ####  $p < 0,001$  em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL..... 43
- Gráfico 3 -** Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc001 até Jc050 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *S. epidermidis*. As barras indicam a média de absorvância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustentados indicam a significância estatística ##  $p < 0,01$  e ####  $p < 0,001$  em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL..... 45
- Gráfico 4 -** Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc051 até Jc101 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *S. epidermidis*. As barras indicam a média de absorvância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustentados indicam a significância estatística ####  $p < 0,001$  em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL..... 46
- Gráfico 5 -** O gráfico compara a atividade antibacteriana dos extratos fúngicos endofíticos de amplo espectro: Jc047, Jc041, Jc061 com os controles de amoxicilina de 100 e 10 mg/mL contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*. As colunas representam a média de absorvância corrigida para cada tratamento. As barras representam o Desvio Padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos respectivos controles..... 47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Reagentes adicionados em cada poço de acordo com o tratamento aplicado.	<b>32</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Quantidade dos reagentes utilizados no teste de atividade antibacteriana.....	<b>33</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Média da contagem dos quadrantes e cálculo da concentração de conídios em cada amostra. Contagem de conídios dos fungos endofíticos da <i>J. curcas</i> testados de Jc001 a Jc101.....	<b>37</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**°C** - Graus Celsius

**Atm** -Atmosfera

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**USP** - Universidade de São Paulo

***J. curcas*** - *Jatropha curcas*

***E. coli*** - *Escherichia coli*

***S. epidermes*** - *Staphylococcus epidermidis*

**q.s.p** - Quantidade suficiente para

**BSA** - Batata-Sacarose-ágar

**g/L** - Grama (s) por litro

**mL** - Mililitro

**rpm** - Rotações por minuto

**g** - Gramas

**µL** - Microlitro

**min** - Minuto (s)

**h** - Hora (s)

**mg** - Miligrama

**mg/mL** - Miligrama (s) por mililitro

**UFMG** - Universidade Federal de Campina Grande

**CDSA** - Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS EPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
3.1	CRISE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	19
3.2	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.....	20
3.3	PINHÃO-MANSO ( <i>Jatropha curcas</i> ).....	21
3.4	FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	22
3.5	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ( <i>E. COLI</i> ) E <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> ( <i>S. EPIDERMIDIS</i> ).....	23
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
4.1	COLETA E DESINFECÇÃO DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE VEGETAL.....	25
4.2	CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFITICOS.....	26
4.3	ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS EM MEIO DE BATATA, SACAROSE E AGAR (BSA).....	26
4.4	PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	27
4.5	PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM MEIO DE AVEIA.....	28
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	29
4.6.1	<b>Preparo do meio de cultura líquido.....</b>	<b>29</b>
4.6.2	<b>Preparo do inóculo bacteriano.....</b>	<b>29</b>
4.6.3	<b>Diluição do antibiótico.....</b>	<b>30</b>
4.6.4	<b>Ensaio da viabilidade celular pelo método colorimétrico da resazurina.....</b>	<b>30</b>
4.6.5	<b>Preparo e adição da Resazurina.....</b>	<b>33</b>
4.6.6	<b>Leitura das microplacas.....</b>	<b>33</b>
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDÓFITOS DA <i>Jatropha curcas</i> .....	36
5.2	PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	37
5.3	TESTE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS CONTRA A <i>E. coli</i> E <i>S. epidermidis</i> .....	38
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A resistência microbiana aos antibióticos tem se intensificado, tornando-se um dos principais obstáculos para a saúde pública em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2023), bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, são exemplos de microrganismos que demonstram resistência a vários medicamentos. Essa situação compromete a eficácia dos tratamentos convencionais e aumenta as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas. Assim, para enfrentar o problema crescente da resistência, diversas soluções têm sido propostas, com ênfase na utilização de metabólitos secundários de plantas.

Os metabólitos secundários são substâncias geradas por organismos como fungos e bactérias em plantas, que, embora não sejam fundamentais para seu crescimento ou a reprodução, exercem papéis significativos na defesa contra predadores, na adaptação ao meio ambiente e na interação com outras espécies. Esses compostos ou os chamados fitoquímicos podem apresentar propriedades terapêuticas, e podem ser utilizados para o desenvolvimento de medicamentos (Gupta *et al.*, 2023).

Os fitoquímicos mais relevantes identificados em organismos endofíticos incluem: glicoproteínas, triterpenos, limonóides, flavonoides, fenóis, taninos, nimbinas, saponinas, catequinas, azadiractina e ácido gálico. No entanto, os metabólitos de fungos que já foram isolados e caracterizados indicam que mais da metade dessas moléculas possui atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral. Entre eles, destacam-se a penicilina, cefalosporina, ergotrato e estatinas, que são metabólitos secundários produzidos por fungos (Ricci *et al.*, 2022).

A *Jatropha curcas*, espécie conhecida como pinhão-mansão, é uma planta oleaginosa, que se destaca pela sua relevância e potencial farmacológico. No Brasil encontra-se um vasto cultivo e pesquisas, principalmente no desenvolvimento de aplicações na indústria farmacêutica (Malosso *et al.*, 2023).

Na medicina tradicional, o látex do pinhão-mansão é utilizado como cicatrizante, hemostático e purgante. As raízes dessa planta são vistas como diuréticas e com propriedades contra leucemia, enquanto as folhas são indicadas para tratar doenças de pele, reumatismo e sífilis. As sementes, embora tenham características purgativas, podem causar intoxicações severas e até letais em crianças e adultos se consumidas em excesso. A toxicidade da planta é devido à presença de globulina curcasina e ácido jatrópico, que possuem níveis de toxicidade

semelhantes ou até superiores à ricina encontrada nas sementes da mamona (Drumond *et al.*, 2008).

Essa espécie tem sido amplamente explorada por seu potencial na produção de metabólitos secundários bioativos, como terpenos, esteroides, alcaloides, saponinas, taninos, lignanas, flavonoides e peptídeos, que apresentam diversas propriedades medicinais, incluindo atividades antibacteriana e antifúngica. Assim, a exploração comercial de biofarmacêuticos destaca-se entre os principais potenciais dessa planta (Malosso *et al.*, 2023).

Diante da crescente necessidade por novos antibióticos eficazes para combater infecções causadas por cepas bacterianas resistentes, torna-se urgente explorar fontes alternativas para a descoberta de moléculas bioativas. A biodiversidade ainda pouco explorada, especialmente a microbiana, tem o potencial de fornecer compostos com valor farmacêutico que podem ajudar a mitigar a crise global da resistência antibiótica, uma das maiores ameaças à saúde pública.

Nesse contexto, os fungos endofíticos de *Jatropha curcas* se destacam como promissores produtores de metabólitos secundários com aplicações farmacológicas, como antibióticos. A relevância do estudo e da produção desses metabólitos está associada ao fato de que a biodiversidade microbiana contribui para a geração de uma ampla variedade de substâncias utilizadas na indústria, especialmente no setor farmacêutico, gerando bilhões de dólares globalmente (Melo, 2021).

Ademais, a produção de compostos bioativos por meio de processos fermentativos de extratos brutos de microrganismos apresenta-se como uma estratégia promissora para a biotecnologia e os bioprocessos industriais. Esse método não só permite a produção em larga escala, reduzindo os custos, como também promove a sustentabilidade, pois evita a exploração excessiva dos recursos vegetais naturais (Gurgel *et al.*, 2023).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados da *Jatropha curcas*.

### 2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos do Pinhão-Manso;
- Induzir a produção de metabólitos secundários a partir dos fungos endofíticos isolados;
- Avaliar o potencial antibacteriano de extratos de metabólitos secundários produzidos pelos endófitos sobre a *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa e *Staphylococcus epidermidis*, bactéria Gram-positiva usando o método da resazurina;
- Identificar por meio da análise estatística, os isolados que produzem maior potencial antibiótico;
- Identificar os isolados que possuem potencial para produção de moléculas com atividade antibiótica de amplo espectro.

### 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CRISE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são medicamentos que revolucionaram o tratamento de infecções bacterianas, resultando em uma redução drástica das taxas de morbidade e mortalidade associadas a essas doenças em todo o mundo (Costa *et al.*, 2017). A resistência aos antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde global, resultante do uso excessivo e indiscriminado desses medicamentos. Isso leva à seleção de bactérias resistentes, que podem sobreviver e proliferar mesmo na presença de antibióticos que antes mostravam-se eficazes (Dolecek *et al.*, 2022; Murray *et al.*, 2022). Algumas bactérias não possuem um alvo molecular específico para a ação dos antibióticos ou são impermeáveis a esses agentes, é o que resulta no desenvolvimento de resistência bacteriana e pode levar ao óbito (Brito *et al.*, 2021).

A penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928, foi o primeiro antibiótico amplamente utilizado no tratamento de infecções bacterianas. Derivado do fungo *Penicillium notatum*, a penicilina pertence à classe dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e atua inibindo sintomas da parede celular bacteriana, resultando na morte das bactérias. Sua ação é mais eficaz contra bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus*. O uso em larga escala durante a Segunda Guerra Mundial contribuiu para o impulsionamento da resistência a este medicamento (Saldanha *et al.*, 2018).

O uso inadequado ou excessivo da penicilina e de outros antibióticos levou ao surgimento da resistência bacteriana, um problema crescente que ameaça a eficácia de tratamentos antimicrobianos. A resistência tem sido observada em várias cepas bacterianas, exigindo a busca por novos medicamentos e estratégias terapêuticas para controlar infecções. As bactérias que deveriam ser combatidas, como o *Staphylococcus sp.*, desenvolveram resistência à ação de enzimas, como as beta-lactamases, o que torna o tratamento ineficaz contra certas infecções (Aslam *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2017).

De acordo com a OMS, citado por Bertuol e colaboradores (2023), os antimicrobianos estão entre os medicamentos mais prescritos, sendo que nem sempre a sua indicação é necessária. Prates e colaboradores (2020), apontou que segundo a Organização Mundial de Saúde o total de gêneros de bactérias classificados como resistentes cresceu consideravelmente, subindo de 7 em 2014 para 12 em 2017. Em 2024, esse número atualizou para 15 famílias (Organização Mundial da Saúde, 2024).

Entre os gêneros de microrganismos que geram grande preocupação, destacam-se o *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina e à meticilina, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.* e *Acinetobacter spp.* são bactérias com resistência a múltiplos medicamentos (Mota *et al.*, 2018; Brito *et al.*; 2022).

No Brasil, o principal desafio relacionado à resistência bacteriana envolve cepas de *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que produzem beta-lactamases. Além disso, cepas de *Klebsiella pneumoniae* que geram carbapenemases contribuem para o aumento das taxas de mortalidade (Mota *et al.*, 2018).

A escassez de novos antimicrobianos de amplo espectro é um fator que sustenta e agrava a crise da resistência bacteriana. À medida que as bactérias desenvolvem resistência aos antibióticos existentes, as opções de tratamento tornam-se cada vez mais limitadas, especialmente para infecções graves e causadas por bactérias multirresistentes, conhecidas como superbactérias. De acordo com Marchiori (2021), atualmente, há 43 antibióticos em desenvolvimento, mas eles não conseguem combater de forma eficaz as superbactérias incluídas na Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários (BPPL) da OMS, que abrange 13 tipos de bactérias e serve desde 2017. Contudo, segundo publicação da OMS (2024), a lista foi expandida incluindo 24 patógenos bacterianos de 15 famílias diferentes, classificados em três categorias de prioridade: crítica, alta e média, de acordo com a gravidade da ameaça que representa a saúde pública.

Prates e colaboradores (2020) apontam que o desenvolvimento de novos antibióticos tem diminuído significativamente nas últimas três décadas. As indústrias estão defasadas nesse processo, e, desde 2000, o lançamento de novos antimicrobianos tem sido lento e insuficiente para atender à crescente demanda causada pela resistência bacteriana (Lima *et al.*, 2017).

Portanto, torna-se evidente a necessidade crescente de buscar alternativas que contribuam para o controle da resistência bacteriana, visto que a descoberta de novos antibióticos não tem acompanhado a evolução das infecções resistentes.

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

Ao longo da história, produtos naturais sempre desempenharam uma função importante no tratamento de feridas e doenças, sendo esse saber transmitido desde as culturas tradicionais até os dias de hoje. A vasta biodiversidade, que inclui plantas, fungos, bactérias, insetos e

organismos marinhos, oferece uma grande variedade de compostos bioativos que podem ser explorados para a criação de novos medicamentos (Conti *et al.*, 2012).

A extração de compostos bioativos de fontes vegetais surgiu no Século XVI. No entanto, apenas no Século XVIII que essas substâncias começaram a ser identificadas, marcando o início da transição das plantas medicinais para os produtos farmacêuticos modernos (Viana *et al.*, 2017). Algumas das primeiras substâncias extraídas de plantas destaca-se a morfina, com ação analgésica; a artemisinina, utilizada no combate à malária; a atropina, com efeito anticolinérgico; e a vincristina, com propriedades antitumorais (Viana *et al.*, 2017; Amaral *et al.*, 2019).

Os compostos bioativos, originados do metabolismo secundário das plantas, estão intimamente ligados aos mecanismos de proteção contra as ameaças de patógenos como insetos e microrganismos. Eles exercem funções fisiológicas importantes, protegendo o organismo por meio de diferentes mecanismos (Oliveira *et al.*, 2018). Esses compostos são geralmente classificados em três categorias principais: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Freire, 2022).

As plantas medicinais têm sido empregadas com fins terapêuticos, desempenhando uma função essencial no tratamento de diversas enfermidades ao longo da história. Esse uso tem promovido o avanço da bioprospecção, facilitando a identificação de espécies vegetais que possuam compostos bioativos. Esses compostos podem, então, ser explorados como potencial recurso farmacológico por indústrias farmacêuticas ou biotecnológicas (Araújo *et al.*, 2019).

Plantas presentes no semiárido nordestino possuem potencial para aplicação farmacêuticas, dentre elas o pinhão-manso.

### 3.3 PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*)

A *Jatropha curcas*, pertencente à família *Euphorbiaceae* é conhecida popularmente como pinhão-manso, e no Brasil também é chamada de pião branco. É uma planta arbustiva, caducifólia, e de crescimento rápido, geralmente atinge entre três e cinco metros de altura, e em condições adequadas podem chegar a oito e dez metros (Silva *et al.*, 2010; Witt *et al.*, 2023). É amplamente distribuída em diversas partes do mundo, sendo encontradas principalmente em regiões tropicais, como os continentes das Américas e África (Rocha, 2013).

No Brasil, a *Jatropha curcas* possui ampla distribuição geográfica, graças à sua rusticidade e capacidade de resistir a longos períodos de seca. A planta é altamente adaptável a

diferentes condições edafoclimáticas, sendo encontrada desde o Nordeste até o Sudeste, chegando até o Estado do Paraná (Virgens *et al.*, 2017).

A *J. curcas* é uma planta altamente versátil, utilizada como cerca viva, na recuperação de solos degradados e áridos, além de ser empregada na fabricação de sabão e tintas. Na medicina popular, tem um papel importante como purgante e no tratamento de doenças de pele, e reumatismo (Virgens *et al.*, 2017).

De acordo com Matos e colaboradores (2018), o látex extraído da *J. curcas* é empregado na medicina tradicional para o tratamento de várias condições, como queimaduras e úlceras, e apresenta comprovada ação anticoagulante. Bem como pesquisas fitoquímicas revelaram na sua composição substâncias citotóxicas, anticancerígenas, antibacterianas e antimaláricas.

Autores como Rahu e colaboradores (2021), realizaram um estudo para avaliar a atividade antibacteriana de diferentes partes da planta *Jatropha curcas* contra cepas de bactérias, incluindo *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que os extratos de *J. curcas* apresentaram potencial inibitório contra *E. coli*, especialmente com o uso de extrato aquoso da raiz, que inibiu significativamente o crescimento da bactéria ( $35,25 \pm 0,35$  mm).

### 3.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Os endófitos, como definidos por Bacon e Write, são microrganismos que colonizam os tecidos internos de plantas saudáveis sem causar danos imediatos ou sintomas de doença na planta hospedeira (Chapla *et al.*, 2013). Esses organismos simbióticos podem incluir tanto fungos quanto bactérias, e sua presença pode beneficiar a planta ao promover o crescimento, aumentar a resistência a estresses ambientais, ou até mesmo induzir a produção de compostos bioativos com potenciais aplicações na medicina e na biotecnologia (Hashem *et al.*, 2023).

Recentemente, cresceu o reconhecimento de que os fungos endofíticos têm uma contribuição importante para o aumento da qualidade e a quantidade de compostos medicinais gerados pelas plantas. As interações específicas entre o fungo e a planta hospedeira impactam diretamente na produção de metabólitos relevantes. Ao aprofundar o entendimento dessas relações, é possível otimizar a produção de medicamentos ao ajustar as condições de cultivo (Jia *et al.*, 2016).

Esses fungos endofíticos são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários com diferentes composições químicas. Esses compostos se destacam por suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias, anticancerígenas e antivirais (Hashem *et al.*, 2023).

Diante de todos os avanços e descobertas apresentados, torna-se claro que os microrganismos endofíticos, particularmente os fungos, representam uma fonte promissora de metabólitos bioativos com grande potencial biotecnológico. A exploração de plantas medicinais, como *Jatropha curcas*, que já demonstraram propriedades terapêuticas, reforça a importância desses microrganismos na busca por novos compostos antibacterianos. Os fungos endofíticos são especialmente valorizados na produção de metabólitos secundários, os quais, têm desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento de terapias inovadoras, incluindo novos agentes antibacterianos (SILVA *et al.*, 2022).

Dessa forma, os fungos endofíticos de plantas naturais não apenas ampliam as fronteiras da ciência, mas também oferecem soluções promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos, reafirmando sua importância no combate global a diversas doenças.

### 3.5 ESCHERICHIA COLI (E. COLI) E STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS (S. EPIDERMIDIS)

Conforme destacado por Totoro *et al.* (2017), as bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, possuem uma membrana externa adicional em sua parede celular, que pode conferir resistência a determinados agentes antibacterianos. Por outro lado, as bactérias Gram-positivas, como *S. epidermidis*, possuem uma parede celular com uma camada espessa de peptidoglicano, influenciando a forma como as substâncias antimicrobianas interagem com elas. A utilização dessas duas espécies bacterianas é importante para a avaliação da eficácia e espectro de ação dos extratos fúngicos sobre diferentes tipos de bactérias.

*Escherichia coli* é uma das bactérias mais estudadas e é comum no intestino humano, estabelecendo-se logo após o nascimento. Apesar de seu papel benigno na maioria das circunstâncias, certas cepas de *E. coli* são patogênicas, causando infecções em diversos sistemas do corpo, como o trato urinário, gastrointestinal, corrente sanguínea e até meningite (Méndez, 2020).

Desde que a penicilina foi introduzida na década de 1940, a resistência antimicrobiana tem aumentado de forma contínua, representando hoje uma ameaça global. A *E. coli*, em particular, tem contribuído significativamente para essa crise ao desenvolver mecanismos de resistência e transferir genes de resistência para outras bactérias. Essa bactéria pode adquirir e disseminar genes resistentes, especialmente devido ao seu comportamento em interações intestinais com outras espécies bacterianas (Méndez, 2020).



*Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria permanente da microbiota humana, normalmente encontrado na pele e nas membranas mucosas. Sob condições normais, esta bactéria estabelece uma relação comensal com o hospedeiro, proporcionando benefícios como a competição com patógenos mais virulentos (Brescó *et al.*, 2017).

No entanto, *S. epidermidis* pode se tornar um patógeno oportunista, especialmente em pacientes que utilizam dispositivos médicos implantados. Sua capacidade de adesão a superfícies e formação de biofilmes facilita infecções relacionadas a dispositivos médicos, como próteses ortopédicas, onde a formação de biofilmes se torna um fator chave para infecções invasivas. O crescimento da resistência às bactérias torna essas infecções particularmente difíceis de tratar, o que representa um problema clínico significativo e crescente, especialmente com o uso cada vez maior desses dispositivos (Brescó *et al.*, 2017).

A avaliação do potencial antibacteriano dos extratos fúngicos da *Jatropha curcas* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* é relevante devido às diferenças estruturais dessas bactérias e suas implicações na resistência a antibióticos. *E. coli*, Gram-negativa, possui uma membrana externa que aumenta sua resistência, enquanto *S. epidermidis*, Gram-positiva, tem uma parede celular espessa que também interfere na ação antimicrobiana. Ambas apresentam alta capacidade de desenvolver resistência, tornando suas infecções difíceis de tratar, especialmente as associadas a dispositivos médicos e infecções sistêmicas (Totorá *et al.*, 2017; Brescó *et al.*, 2017; Méndez, 2020). O estudo dos extratos fúngicos surge como uma alternativa promissora para enfrentar esse desafio.

## 4 METODOLOGIA

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

A seguir, são descritos os procedimentos para a construção da coleção de fungos endofíticos de *Jatropha curcas* e a realização do ensaio de atividade antibacteriana utilizando o método de diluição em microplaca.

### 4.1 COLETA E DESINFECÇÃO DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE VEGETAL

As amostras do caule do Pinhão-Manso foram coletadas nas mediações do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG/CDSA) – Sumé, localizada no Cariri paraibano, coordenadas geográficas 7° 40' 18" Sul, 36° 52' 54" Oeste. Essa região se caracteriza por apresentar clima semiárido e está inserida no bioma Caatinga. Após a coleta, sucedeu a desinfecção do material coletado com álcool 70%, a fim de eliminar formas vegetativas de microrganismos presentes na superfície dos galhos das amostras. Na Figura 1, é possível observar a planta *Jatropha curcas*, a qual utilizamos para obtenção dos fungos endofíticos.

**Figura 1** - Plantas da espécie *Jatropha curcas* no local de coleta, situado no CDSA.



**Fonte:** Acervo próprio (2024).

## 4.2 CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFITICOS

Para o cultivo dos fungos endofíticos da *Jatropha curcas*, foi utilizado meio de cultura contendo batata, sacarose e ágar (BSA) nas concentrações de 100 g/L, 20 g/L e 6 g/L, respectivamente. Para o preparo do meio, a batata já descascada foi triturada em um liquidificador com 500 mL de água destilada, em sequência, filtrou-se a solução e completou-se o volume com água destilada (q.s.p 1000 mL). A solução foi transferida para um Erlenmeyer, já acrescido de ágar, e seguiu para a etapa de esterilização em autoclave nas condições de 121 °C, a 1 atm, por 15 minutos.

Em seguida, na câmara de fluxo laminar, e com todos os materiais previamente autoclavados, adicionou-se ao meio de cultura 1 g/L de Amoxicilina, vertendo em placas de Petri. Foi adicionado antibiótico ao meio de cultura para impedir a proliferação de bactérias, considerando que a microbiota endofítica também inclui bactérias.

Para realizar a inoculação, o caule do pinhão-mansó foi cortado em pequenos fragmentos para favorecer a transferência dos fungos endofíticos para o meio de cultivo. Os fragmentos foram então colocados em placa de Petri contendo o meio BSA, como apresentado na Figura 2, e incubados a 37 °C em estufa.

**Figura 2** - Placa de Petri com partes dos galhos da *Jatropha curcas* em meio Batata-Sacarose-Agar (BSA).



**Fonte:** Acervo próprio (2024).

## 4.3 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS EM MEIO DE BATATA, SACAROSE E AGAR (BSA)

Após o período de incubação dos pedaços de galhos do pinhão-mansó no meio de cultura BSA, observou-se o crescimento de colônias fúngicas ao redor dos fragmentos do tecido vegetal, cobrindo parcialmente ou totalmente as placas de Petri, como apresentado na Figura 3.

Em seguida, tornou-se necessário separar as colônias que apresentavam variações morfológicas ou características diferenciadas para garantir o isolamento de culturas puras. Para isso, fez-se o repique das colônias, onde faz-se uma transferência de pequenas porções de colônias individuais para novas placas de Petri contendo o meio BSA. O isolamento dessas colônias diminui o risco de contaminação, e obter apenas a colônia isolada.

**Figura 3** - Migração dos fungos presentes nos tecidos internos dos galhos da *Jatropha curcas* para o meio de cultura BSA.



**Fonte:** Acervo próprio (2024).

#### 4.4 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

Com as colônias puras já crescidas e ocupando toda a circunferência das placas, foi realizada a extração de conídios. Para isso, foram adicionados 3 mL de uma solução composta por NaCl (4,5 g/L), detergente aniônico puro (500 µL) e água destilada (500 mL). Utilizando um bastão de vidro, fez-se uma raspagem delicada para desprender os conídios, e a solução obtida foi transferida para tubos de 1,5 mL esterilizados e identificados de acordo com cada amostra.

Após o procedimento descrito anteriormente, a solução de conídios foi diluída nas proporções de 1:10 µL a 1:10<sup>4</sup> µL de solução salina a 0,9% com o intuito de realizar a contagem de conídios em câmara de Neubauer.

Com o auxílio de um contador manual, foram contabilizados os conídios presentes nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer, a contagem dos mesmos em cada quadrante foi realizada seguindo como padrão a regra do L, ou seja, contar os que tocavam a parte inferior e direita do quadrante. Em seguida, foram realizados os cálculos para obter o número total de conídios por mL. Como é descrito por Peres e Curi (2005), a concentração de total de conídios foi calculada de acordo com a fórmula:

#### 4.5 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM MEIO DE AVEIA

Para estimular a produção de metabólitos secundários, preparou-se um meio de cultivo à base de aveia. Inicialmente, foram misturados 5 g de aveia Quaker®, em flocos finos, com 15 mL de água destilada para cada recipiente a ser utilizado. Em seguida, o meio de cultivo foi distribuído em recipientes de vidro com capacidade de 40 mL e autoclavado a 121 °C e 1 atm, por 1 hora.

Após a esterilização, foi adicionado 1 mL da solução contendo  $1 \times 10^7$  conídios ao meio de cultura à base de aveia. Os recipientes foram então incubados em estufa, a 37 °C, por um período de 7 dias, como apresentado na Figura 4.

**Figura 4** - Crescimento dos isolados fúngicos no meio de aveia, incubados a 37 °C, em recipientes de 40 mL.



**Fonte:** Acervo próprio (2024).

Com o objetivo de extrair os metabólitos secundários, após o período de incubação, foram adicionados 10 mL do solvente metanol nos recipientes contendo a cultura em aveia. O material resultante foi coletado e depositado em tubos cônicos, de 50 mL, com tampa rosqueada, sendo posteriormente centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos.

Os extratos contendo os metabólitos secundários extraídos com metanol foram filtrados para separar a fração contendo as biomoléculas de interesse e transferidos com o auxílio de uma micropipeta para tubos cônicos com tampa rosqueada de 15 mL.

Os tubos com os extratos foram mantidos em estufa a uma temperatura média de 60 °C, com variações de até 15 °C para baixo, durante aproximadamente 3 semanas, até a evaporação completa do solvente.

Após a secagem em estufa, foram recuperados em 500 µL de metanol os extratos solúveis no solvente, sendo transferidos para tubos cônicos de polipropileno de 1,5 mL.

## 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

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

### 4.6.1 Preparo do meio de cultura líquido

Para o ensaio de atividade antibiótica, foi utilizado o meio de cultura constituído por caldo de batata acrescido de peptona (5 g/L) e extrato de levedura (2 g/L). No preparo utilizou-se 50 g de batata inglesa. Em um béquer (600 mL) adicionou-se a batata cortada e 250 mL de água destilada e cozinhou-se a batata em micro-ondas, por 10 minutos. O caldo de batata foi transferido para um frasco Erlenmeyer, ao qual foram adicionados 2,5 g de peptona e 1 g de extrato de levedura, ajustando-se o volume para 500 mL e em seguida o meio de cultivo foi autoclavado, por 15 min, a 121 °C e 1 atm.

### 4.6.2 Preparo do inóculo bacteriano

As cepas das bactérias *E. coli* e *S. epidermidis* foram fornecidas pela Prof. Dra. Mabel Calina de França Paz, do Laboratório de Microbiologia da UFCG, Campus de Campina Grande. As bactérias foram repicadas em meio ágar Muller Hinton dentro da câmara de fluxo laminar e incubadas em estufa a 35 °C por 24 h.

Posteriormente, as bactérias foram suspensas em solução salina a 0,9% (previamente autoclavada) e transferida para tubo cônico de 1,5 mL. Logo em seguida, realizou-se a padronização do inóculo.

Em tubos de ensaios com tampa rosqueada, foram adicionados 7 mL de solução salina (0,9%), e acrescentou-se uma pequena quantidade de inóculo, sendo realizado o ajuste do volume para 14 mL com a solução salina de forma a atingir uma turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $1-5 \times 10^8$  UFC/mL).

#### 4.6.3 Diluição do antibiótico

No ensaio de atividade antibacteriana, a amoxicilina foi utilizada como controle positivo, devido ao seu amplo espectro e eficiência validada no tratamento de diversas infecções. Sendo assim, foram reservados 100 mg do antibiótico, provenientes de uma cápsula de 500 mg, diluídos em 1 mL de água deionizada (previamente aquecida em banho maria) com temperatura de 40 °C.

Em seguida realizou-se a diluição seriada de 1:10 µL, 1:100 µL e 1:1000 µL em tubos cônicos de 1,5 mL, resultando em 4 tubos com diferentes concentrações do antibiótico para serem aplicados como controles positivos. Sendo, Tubo 1 (100 mg/mL), Tubo 2 (10 mg/mL), Tubo 3 (1 mg/mL) e Tubo 4 (0,1 mg/mL).

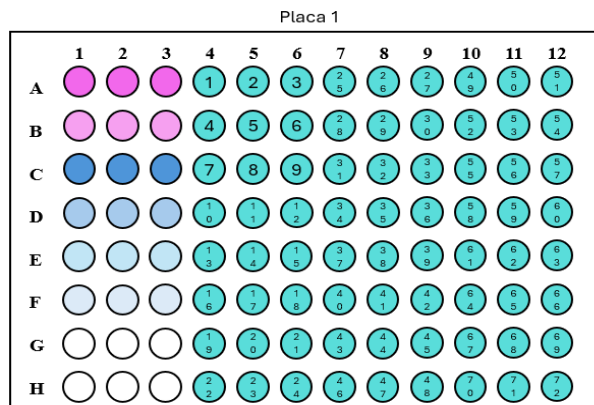
#### 4.6.4 Ensaio da viabilidade celular pelo método colorimétrico da resazurina

O corante resazurina não é tóxico e é amplamente utilizado em ensaios de sensibilidade de fungos, bactérias, células de mamíferos e outros organismos, funcionando como um indicador de atividade metabólica (SILVA *et al.*, 2023). Ele atua como um indicador redox, onde a resazurina é reduzida a resorufina em organismos metabolicamente ativos, resultando em uma mudança de cor de azul para rosa ou no aumento da fluorescência (COSTA *et al.*, 2021).

A resazurina é amplamente utilizada no método de microdiluição, é padronizado, preciso, barato e fácil de executar o qual tem substituído o método de difusão em disco (Elshikh *et al.*, 2016).

O ensaio foi realizado em triplicata, sendo assim, foram utilizadas duas microplacas de 96 poços para cada teste, totalizando três repetições. E como apresentado na Figuras 5, pode-se observar como foi realizada a distribuição e organização das microplacas.

**Figura 5** - Esquema da placa 1 e 2 de 96 poços para o teste de atividade antibacteriana dos extratos fúngicos. A imagem representa o desenho das duas microplacas de 96 poços utilizada no teste de atividade antibacteriana de microrganismos dos extratos fúngicos por microdiluição. Para a placa 1, as linhas A e B (poços 1 a 3) correspondem aos controles negativos, indicados pelos poços coloridos em rosa e as linhas C, D, E e F (poços 1 a 3) em azul, correspondem os controles positivos, onde foram adicionados amoxicilina com diluição seriada. Os poços de 4 a 12 (linhas A a H) contêm os extratos fúngicos testados, sendo cada número preenchido no poço, indica a numeração dos extratos fúngicos na ordem. Para a placa 2, os poços de 1 a 6 (linhas A a H) contêm as amostras dos extratos fúngicos, com os números dentro dos poços representando o número de identificação dos extratos testados.



A1 a A3: Controle negativo

B1 a B3: Controle negativo (metanol)

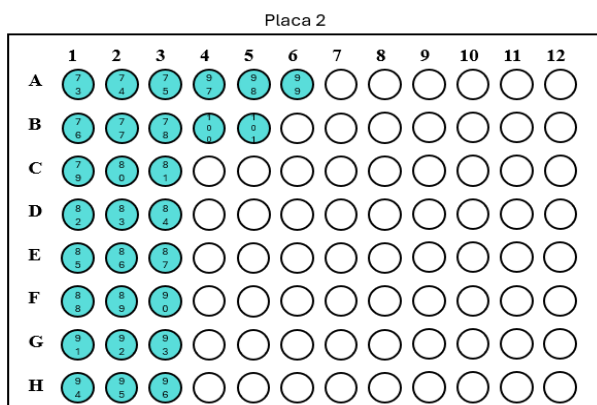
C1 a C3: Controle positivo (100mg)

D1 a D3: Controle positivo (10mg)

E1 a E3: Controle positivo (1mg)

F1 a F3: Controle positivo (0,1mg)

A4 a H12: Amostras



Poços pintados: Contém amostras

Fonte: Autora (2024).

O experimento foi estruturado incluindo os controles negativos, controles positivos com diluições seriadas de antibiótico e os tratamentos com 101 amostras de extratos fúngicos. Os controles negativos, constituíram em poços que não receberam o tratamento experimental, sendo em um grupo deles aplicado 5  $\mu$ L de metanol, uma vez que os extratos haviam sido diluídos em metanol. Dessa forma, utilizando-o como controle negativo pode-se avaliar e afirmar que a inibição do crescimento bacteriano não é decorrente da presença de álcool nas amostras, mas da ação dos tratamentos aplicados.

Para um dos controles negativo utilizou-se o caldo de batata e inóculo, e em outro foi caldo de batata, metanol e inóculo. Já para os controles positivos foram utilizados o caldo, amoxicilina em diluição seriada e inóculo. Nos poços em que foram testados os extratos



fúngicos, foram adicionados o caldo, extratos fúngicos e o inóculo como especificado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Reagentes adicionados em cada poço de acordo com o tratamento aplicado.

<b>Tratamento</b>	<b>Placa/Poços</b>	<b>Reagentes adicionados</b>
<b>Controle negativo</b>	Placa 1/ A1 a A3	Caldo de batata, inóculo e resazurina 0,01%
<b>Controle metanol (negativo)</b>	Placa 1/ B1 a B3	Caldo de batata, metanol, inóculo e resazurina 0,01%
<b>Controles Amoxicilina (positivos)</b>	Placa 1/ C1 a C3; D1 a D3; E1 a E3 e F1 a F3	Caldo de batata, antibiótico em diluição seriada, inóculo e resazurina 0,01%
<b>Extratos fúngicos</b>	Placa 1/ A4 a H12 Placa 2/ A1 a A3; B1 a B3; C1 a C3; D1 a D3; E1 a E3; F1 a F3; G1 a G3; H1 a H3; A4 a A6 e B4 a B5	Caldo de batata, extrato fúngico, inóculo e resazurina 0,01%

**Fonte:** Autora (2024).

As microplacas foram identificadas na câmara de fluxo laminar e em seguida foram preenchidas ao mesmo tempo. Os reagentes foram distribuídos na seguinte ordem: inicialmente foram adicionados o meio de cultura, metanol, antibiótico em diluição seriada, seguidos pelos extratos contendo metabólitos secundários, e por fim distribuiu-se o inóculo em todos os poços com os tratamentos. Essa distribuição foi realizada conforme as especificações apresentadas na Tabela 1. E as quantidades específicas de reagentes colocados em cada poço estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2-** Quantidade dos reagentes utilizados no teste de atividade antibacteriana.

<b>Reagente</b>	<b>Controle negativo (µL)</b>	<b>Controle negativo metanol (µL)</b>	<b>Controles amoxicilina (µL)</b>	<b>Amostras (µL)</b>
<b>Caldo</b>	170	165	160	165
<b>Metanol</b>	-	5	-	-
<b>Inoculo</b>	80	80	80	80
<b>Antibiótico</b>	-	-	10	-
<b>Extrato</b>	-	-	-	5
<b>Resazurina 0,1%</b>	62	62	62	62
<b>Total</b>	312	312	312	312

Fonte: Autora (2024).

Após o preenchimento de todos os poços nas placas, estas foram cobertas com filme plástico e colocadas para incubar na estufa a 37 °C, durante 20 horas.

#### 4.6.5 Preparo e adição da Resazurina

Foram preparados 12 mL da solução corante contendo resazurina 0,01% diluída em solução salina a 0,9%. Após a incubação, o revelador resazurina foi adicionado a todos os poços das microplacas, conforme descrito na Tabela 1, e as placas foram incubadas novamente a 37 °C e adaptado para o tempo de 10 minutos (Wiegand *et al.*, 2008).

#### 4.6.6 Leitura das microplacas

A leitura das microplacas foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por Silva e colaboradores (2023), com adaptações. Logo após o período de reação do revelador, realizou-se a captura das imagens das microplacas utilizando um smartphone Android Redmi Note 12 com o sistema operacional Android 13 MIUI 14, com a câmera de 50 megapixels.

Todas as capturas de imagens das placas, de cada teste foram realizadas com o mesmo smartphone e com a mesma configuração da câmera. Sendo assim, os dados das imagens digitais foram convertidos em dados numéricos.

A obtenção das estimativas colorimétricas da redução do revelador para cada poço das microplacas foi realizada utilizando o software ImageJ, com a aplicação do plugin ReadPlate3.0, de acordo com a metodologia descrita por Angelani (2018).

Portanto, pode-se analisar as imagens fotográficas das microplacas automaticamente, uma vez que esta aplicação permite medir a intensidade da cor em microplacas de 96 poços para um dos três filtros de cores, vermelho, verde ou azul (RGB) e devolve os valores de absorvância corrigidos em branco para cada poço. Para este ensaio, por causa da conversão da cor da resazurina, foi utilizado o filtro azul (Angelani, 2018).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios experimentais foram realizados em triplicata, garantindo maior confiabilidade dos resultados. Os dados numéricos obtidos foram processados no Excel® para o cálculo das médias aritméticas e dos respectivos desvios-padrão, permitindo uma análise preliminar dos dados.

Para a avaliação das diferenças entre os grupos experimentais, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) utilizando o software Statistica®. A ANOVA é uma técnica estatística amplamente utilizada para comparar médias entre dois ou mais grupos e verificar se há diferenças estatisticamente significativas entre eles. Antes de realizar a ANOVA, foram realizados testes de suposições fundamentais, incluindo o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, para assegurar que a distribuição dos dados era normal, e o teste de homogeneidade de variâncias de Levene, que verificou se as variâncias entre os grupos eram homogêneas. Esse método é seguro quando se deseja avaliar a influência de um fator sobre uma variável dependente e determinar se a variabilidade observada entre as médias dos grupos é maior do que seria esperado pelo acaso (Thevapalan, 2024; FM2S, 2024).

ANOVA foi aplicada a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que o valor de F foi significativo, com um valor de p inferior ao nível de significância estabelecido. Com isso, rejeitou-se a hipótese nula, o que sugere que existem diferenças significativas entre as médias dos grupos avaliados.

Como a análise indicou que as médias dos grupos não são todas iguais, foi necessária uma análise adicional, teste de Tukey para determinar quais grupos são diferentes. No software *Statistica*®, após a ANOVA, foi executado o teste de Tukey, utilizando graus de confiança de 95%, 99% e 99,9%, correspondentes aos níveis de significância de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , em suas respectivas ordens.

Com base nesses parâmetros, foi possível identificar os extratos de fungos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle

negativo (metanol), com os controles positivos em diluição seriada com diferentes concentrações de antibiótico e ainda comparar os controles positivos e negativos entre si.

Os fungos em comparação com o controle de amoxicilina com concentração de 100mg/mL, que apresentaram um valor de p inferior a 0,05 foram indicados com um asterisco (\*), aqueles com p inferior a 0,05 e 0,01 com dois asteriscos (\*\*), e os que atingiram o valor de p inferior a 0,05, 0,01 e 0,001 receberam três asteriscos (\*\*\*) nos gráficos.

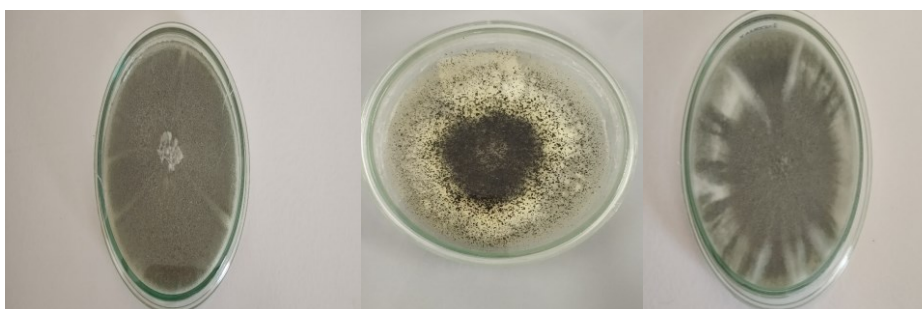
Os que foram comparados com o controle positivo de amoxicilina com concentração de 10 mg/mL, para os mesmos níveis de confiança também foram indicados nos gráficos. Essas identificações foram feitas nos gráficos de barras, os quais se encontram todos os controles e as amostras de cada extrato para cada bactéria que foi testada.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDÓFITOS DA *Jatropha curcas*

A coleção de fungos endofíticos isolados da *J. curcas* foi criada e composta por 101 colônias puras, obtidas a partir da inoculação dos galhos da espécie em meio de cultura BSA. A grande maioria dos fungos isolados apresentaram conídios com coloração esverdeada. Na Figura 6 é possível visualizar os fenótipos de fungos endofíticos encontrados na *Jatropha curcas*.

**Figura 6** - Placas de Petri contendo colônias puras de fungos endófitos isolados da *Jatropha curcas* com diferentes fenótipos e características morfológicas.



**Fonte:** Acervo próprio (2024).

Após a obtenção das colônias puras, ocorreu a produção de conídios em meio BSA e posterior contagem em câmara de Neubauer. Todos os fungos apresentaram alta produção de conídios, sendo que os maiores valores foram superiores a  $6 \times 10^9$ , observados nos fungos Jc013 ( $6,38 \times 10^9$ ), Jc018 ( $7,28 \times 10^9$ ), Jc027 ( $1,20 \times 10^{10}$ ), Jc070 ( $7,40 \times 10^9$ ), Jc078 ( $6,80 \times 10^9$ ), e Jc080 ( $8,93 \times 10^9$ ). Os menores valores foram inferiores a  $1 \times 10^9$ , observados nos fungos Jc003 ( $9,7 \times 10^8$ ), Jc004 ( $8,2 \times 10^8$ ), Jc005 ( $9,0 \times 10^8$ ), Jc010 ( $8,2 \times 10^8$ ) e Jc011 ( $7,2 \times 10^8$ ).

Ahmad e colaboradores (2016) avaliaram o efeito de temperatura e de diferentes meios de cultura na produção de conídios de fungo e os resultados indicaram que o meio BSA é eficaz na promoção da esporulação, ressaltando sua relevância para otimizar a produção de conídios em ambientes laboratoriais. O que destaca a otimização de processos de extração de conídios para plantas como *Jatropha curcas*.

Na Tabela 3 encontram-se as médias de conídios registrados nos quadrantes da câmara de Neubauer, assim como as quantidades de conídios coletada para cada um dos fungos que foram testados.

**Tabela 3-** Média da contagem dos quadrantes e cálculo da concentração de conídios em cada amostra. Contagem de conídios dos fungos endofíticos da *J. curcas* testados de Jc001 a Jc101.

Fungo	Média	Nº de conídios/mL	Fungo	Média	Nº de conídios/mL	Fungo	Média	Nº de conídios/mL
Jc001	127	3,18×10 <sup>9</sup>	Jc034	98	2,45×10 <sup>9</sup>	Jc068	87	2,18×10 <sup>9</sup>
Jc002	57	1,43×10 <sup>9</sup>	Jc035	136	3,40×10 <sup>9</sup>	Jc069	82	2,05×10 <sup>9</sup>
Jc003	39	9,75×10 <sup>8</sup>	Jc036	168	4,20×10 <sup>9</sup>	Jc070	296	7,40×10 <sup>9</sup>
Jc004	33	8,25×10 <sup>8</sup>	Jc037	173	4,33×10 <sup>9</sup>	Jc071	198	4,95×10 <sup>9</sup>
Jc005	36	9,00×10 <sup>8</sup>	Jc038	67	1,68×10 <sup>9</sup>	Jc072	90	2,25×10 <sup>9</sup>
Jc006	69	1,73×10 <sup>9</sup>	Jc039	63	1,58×10 <sup>9</sup>	Jc073	75	1,88×10 <sup>9</sup>
Jc007	41	1,03×10 <sup>9</sup>	Jc040	94	2,35×10 <sup>9</sup>	Jc074	92	2,30×10 <sup>9</sup>
Jc008	47	1,18×10 <sup>9</sup>	Jc041	168	4,20×10 <sup>9</sup>	Jc075	79	1,98×10 <sup>9</sup>
Jc009	159	3,98×10 <sup>9</sup>	Jc042	66	1,65×10 <sup>9</sup>	Jc076	197	4,93×10 <sup>9</sup>
Jc010	33	8,25×10 <sup>8</sup>	Jc043	56	1,40×10 <sup>9</sup>	Jc077	122	3,05×10 <sup>9</sup>
Jc011	29	7,25×10 <sup>8</sup>	Jc044	49	1,23×10 <sup>9</sup>	Jc078	272	6,80×10 <sup>9</sup>
Jc012	51	1,28×10 <sup>9</sup>	Jc045	84	2,10×10 <sup>9</sup>	Jc079	169	4,23×10 <sup>9</sup>
Jc013	255	6,38×10 <sup>9</sup>	Jc046	124	3,10×10 <sup>9</sup>	Jc080	357	8,93×10 <sup>9</sup>
Jc014	160	4,00×10 <sup>9</sup>	Jc047	71	1,78×10 <sup>9</sup>	Jc081	157	3,93×10 <sup>9</sup>
Jc015	53	1,33×10 <sup>9</sup>	Jc048	51	1,28×10 <sup>9</sup>	Jc082	54	1,35×10 <sup>9</sup>
Jc016	72	1,80×10 <sup>9</sup>	Jc049	50	1,25×10 <sup>9</sup>	Jc083	153	3,83×10 <sup>9</sup>
Jc017	119	2,98×10 <sup>9</sup>	Jc050	43	1,08×10 <sup>9</sup>	Jc084	122	3,05×10 <sup>9</sup>
Jc018	291	7,28×10 <sup>9</sup>	Jc051	106	2,65×10 <sup>9</sup>	Jc085	87	2,18×10 <sup>9</sup>
Jc019	130	3,25×10 <sup>9</sup>	Jc052	85	2,13×10 <sup>9</sup>	Jc086	139	3,48×10 <sup>9</sup>
Jc020	79	1,98×10 <sup>9</sup>	Jc053	138	3,45×10 <sup>9</sup>	Jc087	136	3,40×10 <sup>9</sup>
Jc021	126	3,15×10 <sup>9</sup>	Jc054	63	1,58×10 <sup>9</sup>	Jc088	178	4,45×10 <sup>9</sup>
Jc022	129	3,23×10 <sup>9</sup>	Jc055	69	1,73×10 <sup>9</sup>	Jc089	93	2,33×10 <sup>9</sup>
Jc023	180	4,50×10 <sup>9</sup>	Jc056	136	3,40×10 <sup>9</sup>	Jc090	302	7,55×10 <sup>9</sup>
Jc024	125	3,13×10 <sup>9</sup>	Jc057	170	4,25×10 <sup>9</sup>	Jc091	235	5,88×10 <sup>9</sup>
Jc025	152	3,80×10 <sup>9</sup>	Jc058	207	5,18×10 <sup>9</sup>	Jc092	137	3,43×10 <sup>9</sup>
Jc026	48	1,20×10 <sup>9</sup>	Jc059	112	2,80×10 <sup>9</sup>	Jc093	56	1,40×10 <sup>9</sup>
Jc027	479	1,20×10 <sup>10</sup>	Jc060	118	2,95×10 <sup>9</sup>	Jc094	55	1,38×10 <sup>9</sup>
Jc028	205	5,13×10 <sup>9</sup>	Jc061	102	2,55×10 <sup>9</sup>	Jc095	45	1,13×10 <sup>9</sup>
Jc029	198	4,95×10 <sup>9</sup>	Jc062	78	1,95×10 <sup>9</sup>	Jc096	105	2,63×10 <sup>9</sup>
Jc030	52	1,30×10 <sup>9</sup>	Jc063	72	1,80×10 <sup>9</sup>	Jc097	90	2,25×10 <sup>9</sup>
Jc031	198	4,95×10 <sup>9</sup>	Jc064	51	1,28×10 <sup>9</sup>	Jc098	189	4,73×10 <sup>9</sup>
Jc032	153	3,83×10 <sup>9</sup>	Jc065	109	2,73×10 <sup>9</sup>	Jc099	113	2,83×10 <sup>9</sup>
Jc033	95	2,38×10 <sup>9</sup>	Jc066	207	5,18×10 <sup>9</sup>	Jc100	75	1,88×10 <sup>9</sup>
			Jc067	64	1,60×10 <sup>9</sup>	Jc101	208	5,20×10 <sup>9</sup>

Fonte: Autora (2024).

## 5.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Para garantir um crescimento uniforme entre os fungos na produção de metabólitos secundários, o inóculo foi padronizado com 1 mL de solução de conídios contendo  $1 \times 10^9$  conídios, semeado em meio de aveia. Os metabólitos secundários foram produzidos durante o período de incubação de 7 dias na estufa, sendo posteriormente extraídos com metanol. Na Figura 7, observa-se o cultivo em meio de aveia antes da extração dos metabólitos.

As 101 colônias isoladas de *Jatropha curcas* foram testadas quanto à atividade antibacteriana. Trabalhos anteriores, como o de Alves e colaboradores (2020), relataram o potencial dos fungos endofíticos de *Jatropha curcas* na produção de metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, evidenciando sua relevância na biotecnologia e no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Rahu e colaboradores (2021) também avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos de diferentes partes de *Jatropha curcas* contra patógenos humanos, mostrando que o extrato de caule em etanol a 20% apresentou a maior atividade antibacteriana.

**Figura 7** - Cultivo de um dos fungos em meio de aveia após 7 dias de incubação.



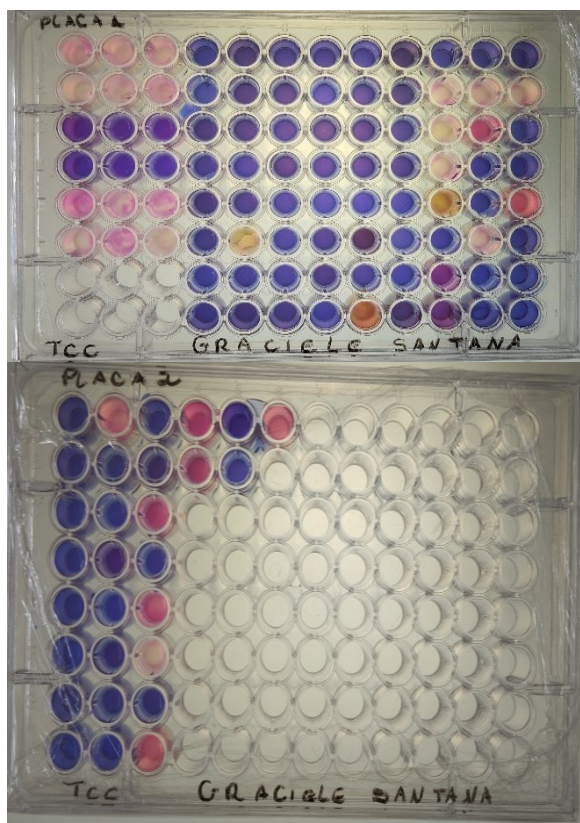
**Fonte:** Acervo próprio (2024).

### 5.3 TESTE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS CONTRA *A. E. coli* E *S. epidermidis*

As bactérias em crescimento foram identificadas utilizando a resazurina, amplamente utilizado para contar células microbianas e avaliar a eficácia de antibióticos, especialmente em ensaios realizados em microplacas de 96 poços, pois muda de cor de azul para rosa à medida que as células reduzem a resazurina em resorufina, indicando assim o crescimento celular.

Após a reação com a resazurina, os poços das microplacas apresentaram colorações rosa e azul características, com algumas variações de cor. Para análise dessas variações, fez -se necessário utilizar ferramentas de análise colorimétrica. A Figura 8 apresenta a imagem das microplacas após a reação da resazurina.

**Figura 8** - Imagem das microplacas após a reação da resazurina, evidenciando as mudanças de cor.



**Fonte:** Acervo próprio (2024).

Jia e colaboradores (2020), avaliaram um ensaio baseado em resazurina para a detecção rápida de resistência a polimixina em bactérias gram-negativas, demonstrando que é um método eficaz para a avaliação rápida de resistência antibiótica.

Kao e colaboradores (2020), tiveram como metodologia o uso de resazurina como indicador do crescimento bacteriano, bem como Elshikh e colaboradores (2016), fez-se uso de método de microdiluição em microplacas de 96 poços baseado em resazurina para determinar a concentração mínima inibitória de biossurfactantes, ou seja, tendo a resazurina como um indicador de viabilidade celular.

Microdiluição em placas de 96 poços baseada em resazurina foi utilizada para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) de óleos essenciais de anis estrelado e orégano sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*. A resazurina, um indicador de desempenho celular, muda de cor de azul para rosa na presença de atividade metabólica, permitindo a avaliação adequada da eficácia antibacteriana dos óleos testados (Shamsudeen *et al.*, 2024).



A leitura das placas, em que foram testados os extratos fúngicos, foi realizada de acordo com as imagens registradas com o smartphone e, posteriormente, scanada no ImageJ. As análises indicaram que os resultados obtidos nos ensaios do presente trabalho são promissores, pois os extratos fúngicos testados podem ter potencial bioativo relevante, como propriedades antibacteriana, isso é sugerido pelo comportamento das placas nas análises de ImageJ, com inibição significativas, contra as bactérias-alvo, que indicam a eficácia dos extratos.

O método empregado neste estudo é reconhecido e adotado por muitos na comunidade científica. Segundo Sychev e colaboradores (2023), foram utilizadas câmeras de smartphones para registrar imagens de placas de 96 poços. O software ImageJ foi posteriormente utilizado para quantificar a intensidade da coloração resultante da redução da resazurina, o que sinaliza a viabilidade das bactérias. As análises das imagens capturadas geraram dados quantitativos que demonstraram conformidade entre os indicadores colorimétricos, fotométricos e espectrais.

Silva e colaboradores (2023), analisaram o desenvolvimento e a validação de um ensaio colorimétrico para avaliar a sensibilidade a fungicidas, utilizando resazurina, por meio do software imageJ. O estudo foi realizado a partir de imagens digitais das culturas em microplacas, capturadas com câmera de smartphone em um transiluminador de baixo custo projetado de forma artesanal para este propósito (Silva *et al.*, 2023).

O potencial antibacteriano dos extratos fúngicos foram avaliados sob as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*.

Os testes de normalidade indicaram que os dados seguem uma distribuição normal, e o teste de homogeneidade de variâncias confirmou que as variâncias entre os grupos são homogêneas. Dessa forma, foi possível aplicar a Análise de Variância (ANOVA) com segurança para avaliar as diferenças entre os grupos.

Observou-se que, quanto maior a média da absorbância corrigida, maior a atividade antibiótica. A concentração de metanol utilizada nos testes não afetou o crescimento bacteriano, conforme indicado pelos dados. O teste estatístico de Tukey confirmou que não houve diferença significativa entre o controle de metanol e o controle negativo para *E. coli* e *S. epidermidis*, reforçando que o metanol não interferiu no crescimento. Dessa forma, a inibição bacteriana observada nos poços pode ser atribuída aos extratos fúngicos, uma vez que as diluições foram feitas com metanol, e a quantidade de extrato utilizada foi equivalente à do controle negativo de metanol 5  $\mu$ L.

Foram testados extratos de 101 fungos endofíticos, dos quais 91 (90,09%) apresentaram uma atividade antibacteriana, em relação ao controle negativo na presença de metanol (5 $\mu$ L)

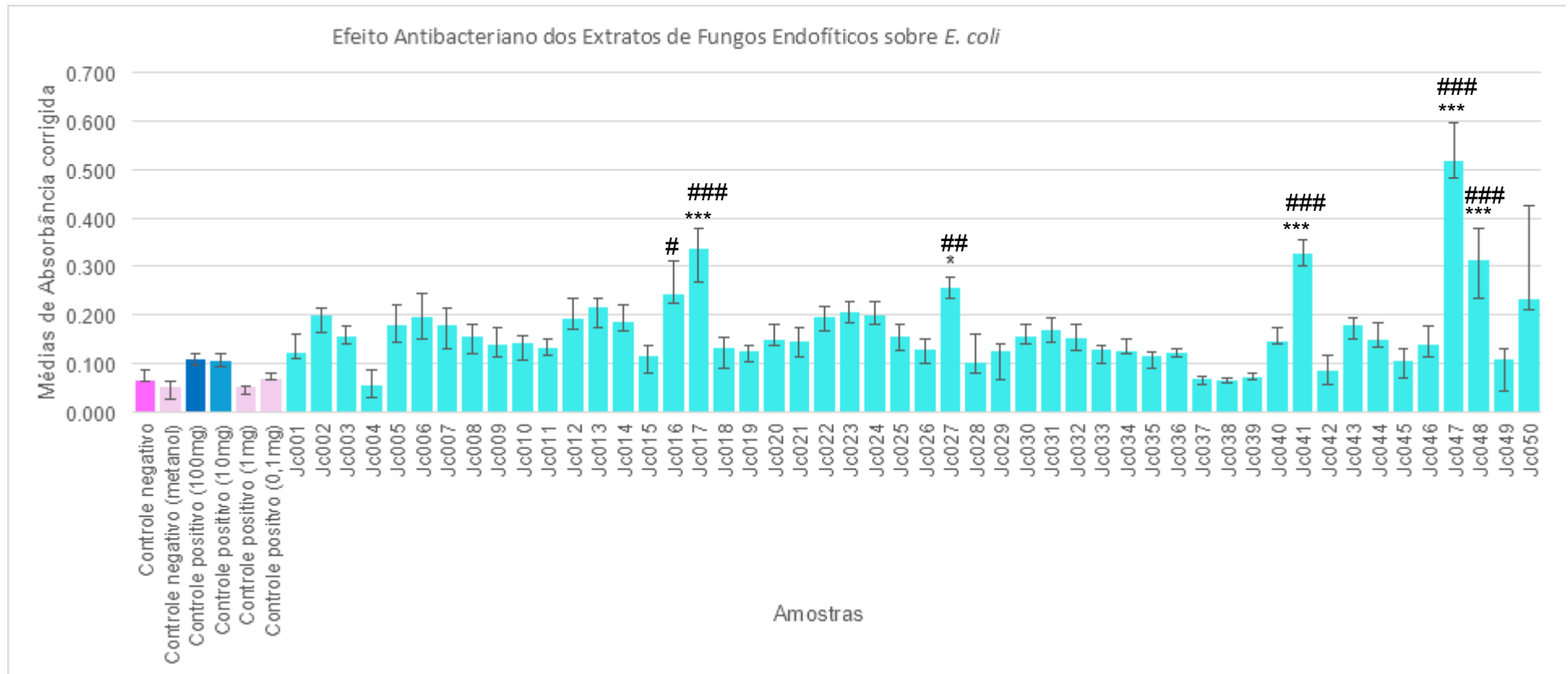
sobre a bactéria *E. coli*. E para a bactéria *S. epidermidis*, 80 (79,21%) dos extratos testados apresentaram atividade antibacteriana comparado ao mesmo controle.

Os extratos Jc017, Jc027, Jc041, Jc047, Jc048 e Jc061 apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle de amoxicilina a 100 mg/mL, considerando que foram adotados os níveis de significância de 1, 5 e 10%, mostrando atividade antibacteriana contra *E. coli*. Destes, os extratos Jc017, Jc041, Jc047, Jc048 e Jc061 apresentaram médias de inibição superiores ao controle positivo de amoxicilina, indicando maior eficácia antibacteriana. O extrato Jc027 também apresentou atividade relevante com  $p < 0,05$ , mas com menor potencial comparado aos demais.

Ainda em relação com testes realizados com *E. coli*, os extratos Jc016, Jc017, Jc027, Jc041, Jc047, Jc048 e Jc061 foram comparados ao controle positivo com amoxicilina a 10 mg/mL. Os extratos Jc017, Jc041, Jc047, Jc048 e Jc061 mostraram forte atividade antibacteriana, enquanto Jc027 e Jc016 exibiram efeito antibacteriano moderado.

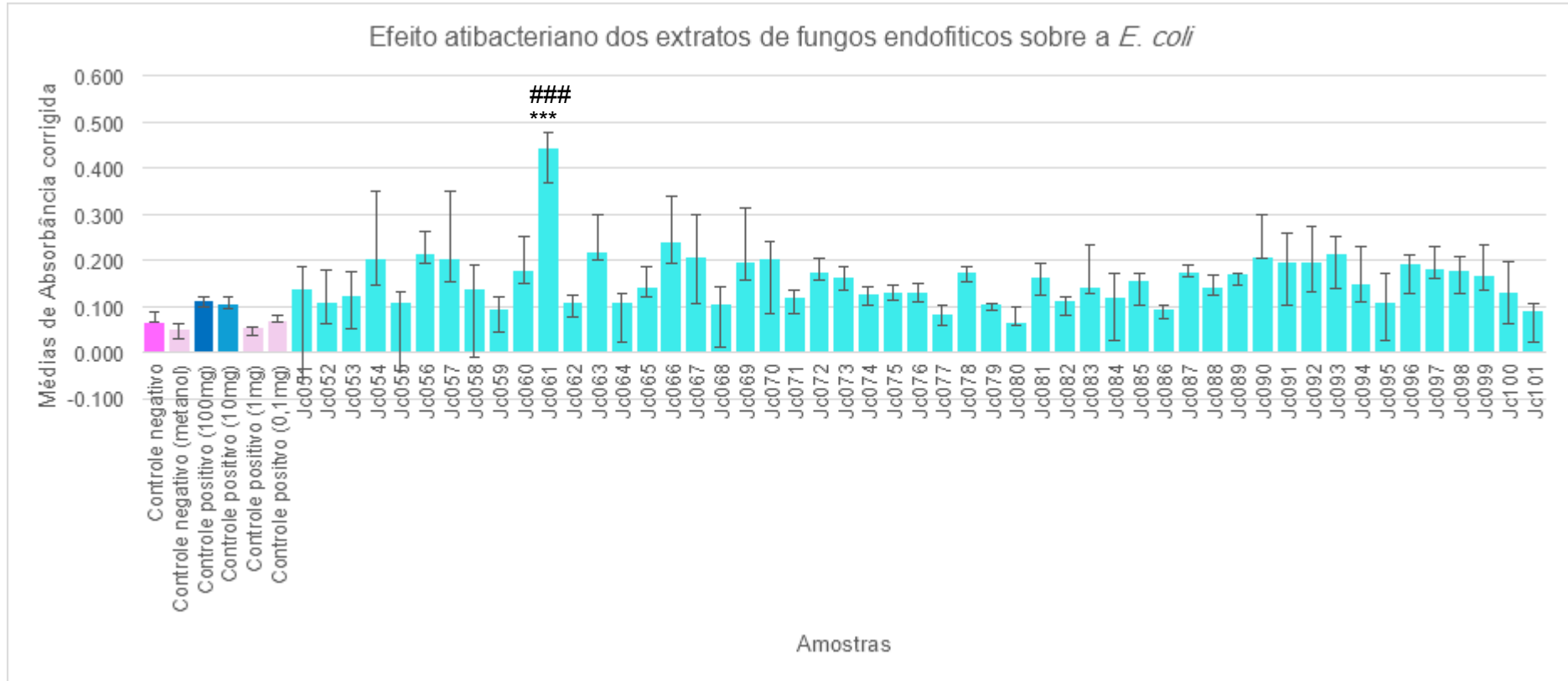
Os Gráficos 1 e 2 são apresentados os extratos que apresentaram diferenças estatísticas em relação ao antibiótico, evidenciando aqueles com médias de absorvância superiores, e, conseqüentemente, maior atividade antibacteriana nas concentrações de 100 mg/mL e 10 mg/mL de amoxicilina.

**Gráfico 1** - Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc001 até Jc050 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli*. As barras indicam a média de absorbância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustenidos indicam a significância estatística #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$ , em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL.



Fonte: Autora (2024).

**Gráfico 2-** Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc051 até Jc101 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli*. As barras indicam a média de absorbância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustenidos indicam a significância estatística ###  $p < 0,001$  em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL.



Fonte: Autora (2024).

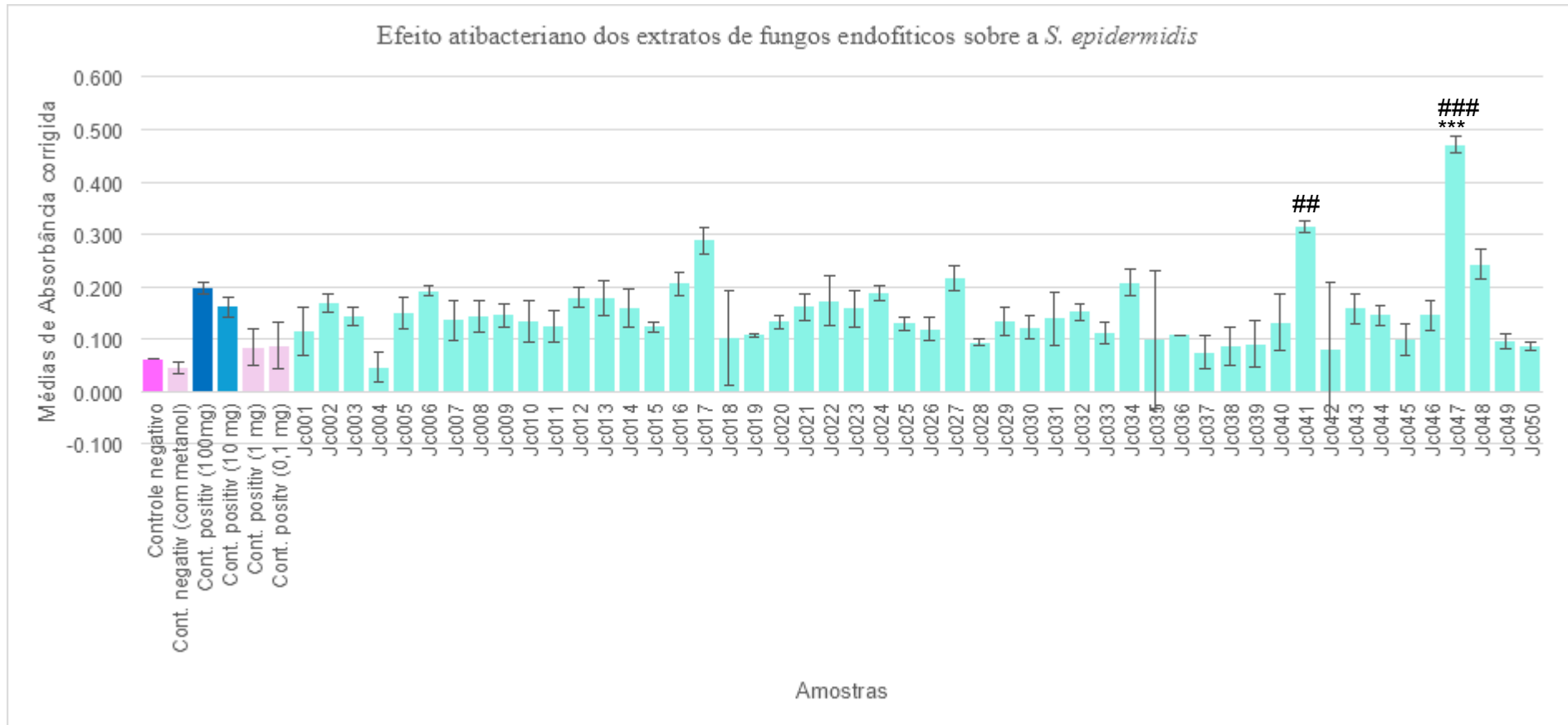
Para a atividade antibiótica contra a bactéria *S. epidermidis*, a comparação entre o controle de metanol e o controle positivo de amoxicilina de 100 mg/mL, indicou que o controle positivo apresentou uma diferença estatisticamente significativa, mostrando inibição de bactérias nesses controles.

O extrato fúngico Jc061 apresentou diferença significativa em relação ao controle positivo com amoxicilina com concentração de 100 mg/mL, com nível de confiança de 99%, enquanto o extrato Jc047 mostrou uma diferença ainda mais expressiva, com um nível de confiança de 99,9%. Sendo assim, o extrato Jc047 apresentou a maior atividade antibiótica, seguido por Jc061, que também demonstrou atividade significativa, mas em menor intensidade.

Esses resultados ressaltam que os extratos Jc047 e Jc061 têm maior eficácia em comparação à amoxicilina de 100 mg/mL e aos outros tratamentos avaliados. Ao considerar o controle positivo com uma concentração de 10 mg/mL, as análises estatísticas pelo teste de Tukey mostraram que três extratos, Jc041, Jc047 e Jc061, apresentaram atividade de inibição superiores. Jc041 teve um nível de confiança de 99%, enquanto Jc047 e Jc061 demonstraram maior eficácia antibacteriana com níveis de confiança de 99,9%.

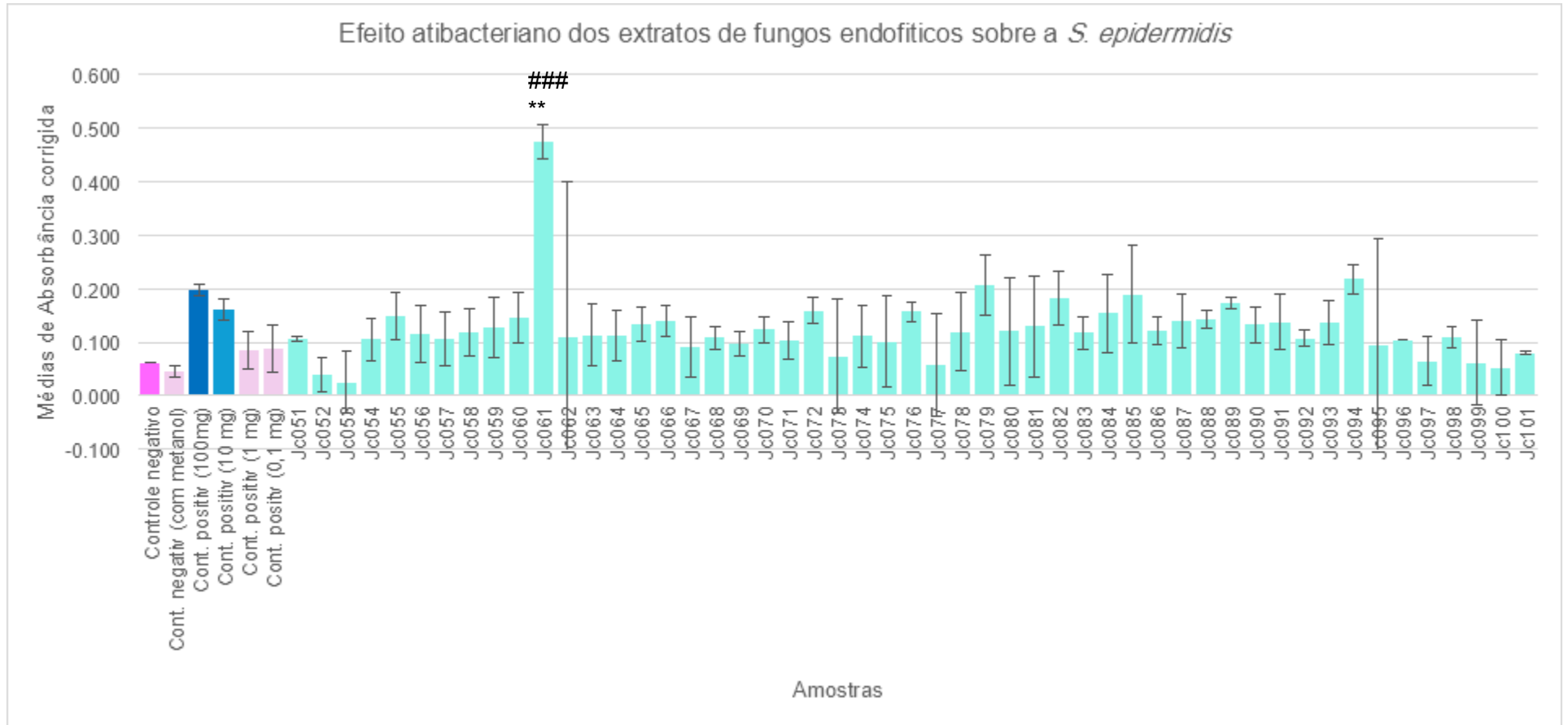
Os Gráficos 3 e 4 são apresentados de forma clara os extratos que apresentaram diferenças estatísticas significativas em comparação com o antibiótico, destacando os extratos Jc041, Jc047 e Jc061, que tiveram médias de absorvância maiores do que o antibiótico testado na concentração de 100 mg/mL e 10 mg/mL. A visualização gráfica reforça os resultados, facilitando a identificação dos extratos com maior atividade antibacteriana, confirmada pelos testes estatísticos.

**Gráfico 3-** Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc001 até Jc050 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *S. epidermidis*. As barras indicam a média de absorvância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustenidos indicam a significância estatística ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL.



Fonte: Autora (2024).

**Gráfico 4-** Efeito dos extratos fúngicos endofíticos de Jc051 até Jc101 testados em relação à atividade antibacteriana contra a bactéria *S. epidermidis*. As barras indicam a média de absorbância corrigida dos extratos, com desvios-padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle positivo de amoxicilina 100 mg/mL. Os sustenidos indicam a significância estatística ####  $p < 0,001$  em relação apenas ao controle de amoxicilina 10 mg/mL.

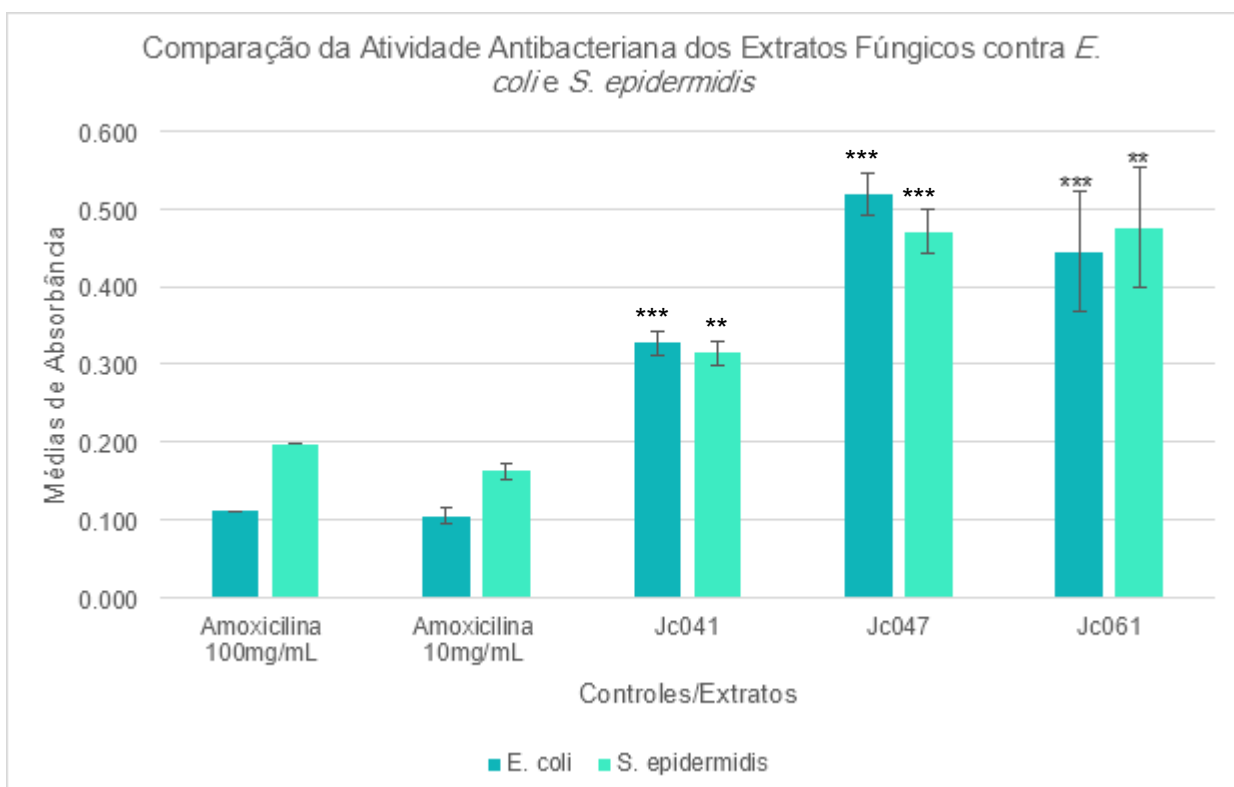


**Fonte:** Autora (2024).

Após as análises, os extratos Jc041, Jc047 e Jc061 destacaram-se por sua atividade antibacteriana superior a amoxicilina, tanto contra *E. coli* quanto contra *S. epidermidis*. Ressaltando que o extrato Jc041 demonstrou uma inibição superior a amoxicilina na concentração de 10 mg/mL para *S. epidermidis*. Essa eficácia contra bactérias de diferentes grupos aponta que os compostos bioativos presentes nesses extratos têm potencial para atuar sobre uma ampla gama de microrganismos, tornando-os candidatos para o desenvolvimento de antibióticos de amplo espectro, uma característica especialmente relevante frente à crescente resistência bacteriana.

Como mostrado no Gráfico 5, os extratos Jc047, Jc041 e Jc061 exibiram maior eficácia contra *E. coli* e *S. epidermidis* em comparação aos controles de amoxicilina de 100 mg/mL e 10 mg/mL.

**Gráfico 5-** O gráfico compara a atividade antibacteriana dos extratos fúngicos endofíticos de amplo espectro: Jc047, Jc041, Jc061 com os controles de amoxicilina de 100 e 10 mg/mL contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*. As colunas representam a média de absorvância corrigida para cada tratamento. As barras representam o Desvio Padrão. Os asteriscos indicam a significância estatística \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos respectivos controles.



Fonte: Autora (2024).



A prospecção de fungos endofíticos tem atraído grande interesse na biotecnologia, devido à capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas atividades biológicas. Estudos anteriores já demonstraram o potencial antioxidante de fungos endofíticos, como *Aspergillus nidulans*, isolados de *Jatropha curcas* (Alves et al., 2020). Além disso, extratos de *Jatropha curcas* mostraram atividade antibacteriana significativa contra *E. coli* e *S. epidermidis*, reforçando o potencial desses fungos na inibição de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (Rampadarath et al., 2018).

Os resultados do presente estudo estão em consonância com as descobertas de Rahu e colaboradores (2021), que relataram que extratos de diferentes partes de *J. curcas* mostraram uma forte inibição de *E. coli*, com destaque para o extrato da raiz.

De maneira semelhante, Bintencourt e colaboradores (2011) investigaram a atividade antibacteriana de extratos das folhas de *Jatropha curcas*, destacando a inibição significativa de *Staphylococcus epidermidis* e outras bactérias, com o intuito de desenvolver cosmeceuticos. Os autores utilizaram a técnica de difusão em ágar, observando halos de inibição que indicavam o potencial do extrato para aplicações em tratamentos dermatológicos. De forma similar, o presente estudo avaliou a atividade antibacteriana com ênfase em fungos endofíticos associados à planta, utilizando o método de microdiluição.

Os extratos de *Jatropha curcas* exibiram atividades antibacterianas significativas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*, com inibições superiores às da amoxicilina nas concentrações de 100 mg/mL e 10 mg/mL. Esses resultados são reforçados por outros trabalhos presente na literatura como Rampadarath e colaboradores (2018), Rahu e colaboradores (2021) e Bintencourt e colaboradores (2011), que também destacam o potencial dessa planta no combate à resistência antibacteriana. Assim, os fungos endofíticos de *J. curcas* oferecem novas perspectivas promissoras para o desenvolvimento de terapias naturais eficazes contra infecções bacterianas.

## 6 CONCLUSÕES

- 90% dos fungos testados apresentaram atividade inibitória para *E. coli* e 79% mostraram atividade contra *S. epidermidis* comparado em relação ao controle metanol;
- Os extratos Jc017, Jc041, Jc047, Jc048 e Jc061 apresentaram médias de inibição superiores ao controle positivo de amoxicilina de 100 mg/mL, para a *E. coli*;
- Os extratos Jc047 e Jc061 têm maior eficácia em comparação à amoxicilina de 100 mg/mL, para *S. epidermidis* e o extrato Jc041 maior eficácia comparado ao controle 10 mg/mL.
- Os extratos dos isolados Jc041, Jc047 e Jc061 demonstraram potencial para a produção de biomoléculas com atividade antibiótica de amplo espectro, sendo eficazes contra *E. coli* e *S. epidermidis*.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. A.; GHAZAL, I.; RAJAB, L. H. Avaliação laboratorial do efeito de Temperatura e Vários Meios no Radial Crescimento, Produção de Conídios e Germinação do Fungo *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuil. **Research**, p. 35-41, 2016. Disponível em: <https://www.internationaljournalsrg.org/IJAES/2016/Volume3Issue6/IJAESV3I6P108.pdf>. Acesso em: 12 out. 2024.
- ALVES, D. R. *et al.* Atividades antioxidante, anticolinesterasica e citotóxica de metabolitos de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 9, p. 73684-73691, 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/17558/14249>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- AMARAL, R. G. *et al.* CONTRIBUIÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE TRATAMENTOS PARA O CÂNCER. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v. 5, n. 2, p. 119-134, 2019. Disponível em: [file:///C:/Users/gracy/Downloads/amchagas,+7%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/gracy/Downloads/amchagas,+7%20(2).pdf). Acesso em: 01 set. 2024.
- ANGELANI, C. R. *et al.* A metabolic control analysis approach to introduce the study of systems in biochemistry the glycolytic pathway in the red blood cell. **Biochemistry and Molecular Biology Education**.v.46. p.502-515. 2018. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/17558/14249>. Acesso em: 11 mai. 2024.
- ARAÚJO, M. S.; LIMA, M. M. O. O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos: os conhecimentos etnobotânicos de alunos de escolas pública e privada em Floriano, Piauí, Brasil. **Revista de Educação em Ciências e Matemática**, v. 15, n. 33, p. 235-250, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ufpa.br/index.php/revistaamazonia/article/view/5747>. Acesso em: 30 ago. 2024.
- ASLAM, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Dovepress**, v.11, p. 1645-1658, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6188119/pdf/idr-11-1645.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2024.
- BERTUOL, R. F.; RAMPELOTTO, R. F. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA PELO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS. **Revista REVIVA**, Itapetinga-SC, v.2, n. 1, p. 1-3, 2023. Disponível em: <https://revistas.uceff.edu.br/reviva/article/view/260/327>. Acesso em: 26 jul. 2024.
- BINTENCOURT, M. J. C. *et al.* DESENVOLVIMENTO DE COSMECÊUTICOS A PARTIR DE EXTRATOS ANTIBACTERIANOS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.). **Diálogos & Ciência**, v. 9, n. 27, p. 1-14, 2011. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/269829988\\_Desenvolvimento\\_de\\_cosmeceutico\\_s\\_a\\_partir\\_de\\_extratos\\_bacterianos\\_de\\_pinhao\\_manso\\_Jatropha\\_curcas\\_L\\_](https://www.researchgate.net/publication/269829988_Desenvolvimento_de_cosmeceutico_s_a_partir_de_extratos_bacterianos_de_pinhao_manso_Jatropha_curcas_L_). Acesso em: 04 nov. 2024.
- BRESCÓ, M. S. *et al.* Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1401, p. 1-24, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01401/full>. Acesso em: 03 nov. 2024.

BRITO, A. M. G. *et al.* Uso indiscriminado de antibióticos: uma revisão integrativa. **Bionorte**, Monte Carlos, v. 11, n. 1, p. 219-225, 2022. Disponível em: <http://revistas.funorte.edu.br/revistas/index.php/bionorte/article/view/245/256>. Acesso em: 26 jul. 2024.

BRITO, G. B.; TREVISAN, M. O uso indevido de antibióticos e o eminente risco de resistência bacteriana. **Revista Artigos**, Palmas – TO, v. 30, n. 7902, p. 1-9, 2021. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/artigos/article/view/7902/5093>. Acesso em: 26 jul. 2024.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e299986b-1407-4469-bc08-51480c60dc1e/content>. Acesso em: 15 jul. 2024.

CONTI, R.; GIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. *et al.* Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.64, n.3, 2012. Disponível em: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252012000300014](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000300014). Acesso em: 26 set. 2024.

COSTA, P. *et al.* Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor Escherichia coli and Salmonella Typhimurium Inactivation Mediated by Phages. **Antibiotics**, v. 10, n. 15, p. 1-15, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/8/974>. Acesso em: 22 jun. 2024.

COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. *et al.* Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v.7, n.2, p. 45-57, 2017. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/e9dd/6f9ef66c2f4cb74b683178b78d45d83d46e6.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2024.

DOLECEK, C. *et al.* Drug-resistant bacterial infections: we need urgent action and investment that focus on the weakest link. **PLoS Biology**, v.20, n. 11, p. 1-4, 2022. Disponível em: [file:///C:/Users/gracy/Downloads/journal.pbio.3001903%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/gracy/Downloads/journal.pbio.3001903%20(2).pdf). Acesso em: 02 ago. 2024.

DRUMOND, M. A.; ARRUDA, F. P.; ANJOS, J. B. *et al.* PINHÃO-MANSO - *Jatropha curcas* L. Pinhão-manso - *Jatropha curcas* L. / Marcos Antonio Drumond e Francineuma Ponciano de Arruda, José Barbosa dos Anjos. - Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA-2009-09/40026/1/SDC212.pdf>. Acesso em: 26 set. 2024.

ELSHIKH, M. *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnol Lett**, v. 38, p. 1015-1019, 2016. Disponível em: [file:///C:/Users/gracy/Downloads/s10529-016-2079-2%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/gracy/Downloads/s10529-016-2079-2%20(1).pdf). Acesso em: 28 jun. 2024.

FM2S EDUCAÇÃO E CONSULTORIA. ANOVA: O que é e como utilizar. FM2S, São Paulo, 2024. Disponível em: <https://fm2s.com.br/blog/anova#:~:text=A%20An%C3%A1lise%20de%20Vari%C3%A2ncia%20ou,no%20in%C3%ADcio%20do%20s%C3%A9culo%20XX>. Acesso em: 07 out. 2024.

FREIRE, T. C. COMPOSTOS BIOATIVOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO PIPER NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS. 2022. 92 f. Tese (Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia) - Rede BIONORTE, Porto Velho-RO, 2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1158037/1/TS-2022.003.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2024.

GUPTA, A. *et al.* Endófitos fúngicos: microfábricas de novos compostos bioativos com intervenções terapêuticas; uma revisão abrangente sobre os desenvolvimentos biotecnológicos no campo da biologia endofítica fúngica na última década. **Biomolecules**, v.13, n.1038, p. 1-44, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/7/1038>. Acesso em: 26 set. 2024.

GURGEL, R. S. *et al.* Antimicrobial and Antioxidant Activities of Endophytic Fungi Associated with *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae). **Journal of Fungi**, v.9, n.864, p. 1-19, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/8/864#B11-jof-09-00864>. Acesso em: 28 set. 2024.

HASHEM, A. H. *et al.* Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review. **Microbial Cell Factories**, p. 1-23, 2023. Disponível em: [file:///C:/Users/gracy/Downloads/s12934-023-02118-x%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/gracy/Downloads/s12934-023-02118-x%20(2).pdf). Acesso em: 16 set. 2024.

JIA, H. *et al.* Evaluation of resazurin-based assay for rapid detection of polymyxin-resistant gram-negative bacteria. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 11, p. 1-11, 2020. Disponível em: <file:///C:/Users/gracy/Downloads/Evaluation%20of%20resazurin-based%20assay%20for.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

JIA, M. *et al.* A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 906, p. 1-14, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00906/full>. Acesso em: 16 set. 2024.

KAO, Y. T. *et al.* Gravity-driven microfluidic assay for digital enumeration of bacteria and for antibiotic susceptibility testing. **Royal Society of Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 54-63, 2020. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2020/lc/c9lc00684b>. Acesso em: 28 jun. 2024.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA FRENTE AOS FÁRMACOS: UMA REVISÃO. **Cuid Arte Enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 105-113, 2017. Disponível em: [https://www.webfipa.net/facfipa/ner/sumarios/cuidarte/2017v1/15%20Artigo\\_Mecanismo%20Oresist%C3%A2ncia%20bacteriana%20a%20antibi%C3%B3ticos\\_27-07-17.pdf](https://www.webfipa.net/facfipa/ner/sumarios/cuidarte/2017v1/15%20Artigo_Mecanismo%20Oresist%C3%A2ncia%20bacteriana%20a%20antibi%C3%B3ticos_27-07-17.pdf). Acesso em: 10 ago. 2024.

MALOSSO, M. G.; LEÔNIDAS, L. V.; OLIVEIRA, K. REVISÃO DE LITERATURA SOBRE *JATROPHA CURCAS* L., UMA PLANTA MEDICINAL UTILIZADA PELA POPULAÇÃO DO INTERIOR DO AMAZONAS. In: BARBOSA, Frederico Celestino. Biodiversidade, meio ambiente e desenvolvimento sustentável. 6. ed. Piracanjuba- GO: Editora Conhecimento Livre, 2023. p. 5-12. Disponível em: <https://api.conhecimentolivre.org/ecl-api/storage/app/public/L.780-2023.pdf>. Acesso em: 26 set. 2024.

MARCHIORI, B. Escassez global de novos antibióticos agrava a ameaça das superbactérias. *Jornal da USP*, 24 mai. 2021. Disponível em: <https://jornal.usp.br/atualidades/escassez-global-de-novos-antibioticos-agrava-a-ameaca-das-superbacterias/>. Acesso em: 18 ago. 2024.

MATOS, F. S. *et al.* Factors that influence in *Jatropha curcas* L. latex production. **CROP PRODUCTION AND MANAGEMENT**, Bragantia, Campinas, v. 77, n. 1, p.74-82, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/fgqKtFCsWCbdMY5mLKMgqfp/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 14 set. 2024.

MELO, I. S. **Endofíticos**, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/recursos-geneticos/endofiticos>. Acesso em: 26 set. 2024.

MÉNDEZ, M. G. Infecções por *E. Coli* - Importância do diagnóstico precoce e tratamento eficiente. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/72615>. Acesso: 02 nov. 2024.

MOTA, F. S.; OLIVEIRA, H. A.; SOUTO, R. C. F. *et al.* Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **RBAC**, Goiânia-GO, v. 50, n. 3, p. 270- 277, 2018. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2019/01/RBAC-vol-50-3-2018-ref-740-final.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2024.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325 p. 629-655, 2022. Disponível em: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S0140-6736%2821%2902724-0>. Acesso em: 08 ago. 2024.

OLIVEIRA, R. S. *et al.* COMPOSTOS BIOATIVOS NATURAIS: AGENTES PROMISSORES NA REDUÇÃO DO EXTRESSE OXIDATIVO E PROCESSOS INFLAMATÓRIOS. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, n. 2, p. 258-273, 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/1643/1215>. Acesso em: 01 set. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Resistência antimicrobiana. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 15 set. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Lista de patógenos bacterianos prioritários da OMS, 2024: Patógenos bacterianos de importância para a saúde pública para orientar a pesquisa, o desenvolvimento e as estratégias para prevenir e controlar a resistência antimicrobiana. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>. Acesso em: 27 out. 2024.

PERES, C. M.; CURI, R. Como cultivar células. 1. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 304, 2005.

PRATES, F. I. F. *et al.* AGRAVOS PROVOCADOS PELA RESISTÊNCIA BACTERIANA: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL. **BJSCR**, v.32, n.2, p.131-138, 2020. Disponível em: [https://www.mastereditora.com.br/periodico/20201004\\_093315.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20201004_093315.pdf). Acesso em: 10 ago. 2024.

RAHU, M. I. *et al.* Determination of antimicrobial and phytochemical compounds of *Jatropha curcas* plant. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 2867-2876, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21000929>. Acesso em: 05 set. 2024.

RAMPADARATH, S. *et al.* Diversity, Seasonal Variation and Antibacterial Activity of Endophytic Fungi Associated with the Genus *Jatropha* in Mauritius. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 8, p. 1-8, 2018. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/325261199\\_Diversity\\_Seasonal\\_Variation\\_and\\_Antibacterial\\_Activity\\_of\\_Endophytic\\_Fungi\\_Associated\\_With\\_the\\_Genus\\_Jatropha\\_in\\_Mauritius](https://www.researchgate.net/publication/325261199_Diversity_Seasonal_Variation_and_Antibacterial_Activity_of_Endophytic_Fungi_Associated_With_the_Genus_Jatropha_in_Mauritius). Acesso em: 07 out. 2024.

RICCI, A. P. *et al.* Bioativos Derivados de Fungos Endofíticos Isolados da *Azadirachta indica* (Neem) e suas aplicações. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. 1-10, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/32454/27470>. Acesso em: 15 set. 2024.

ROCHA, N. F. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL EM EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L. 2013. 111 p. Dissertação (Mestrado ao Programa de Pós- Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/20873/1/ROCHA%2c%20N%2c%20c3%20babia%20Ferreira.pdf>. Acesso em: 14 set. 2024.

SALDANHA, D. M. S.; SOUZA, M. B. M.; RIBEIRO, J. F. O USO INDISCRIMINADO DOS ANTIBIÓTICOS: UMA ABORDAGEM NARRATIVA DA LITERATURA. **Revista Interfaces da Saúde**, Fortaleza-CE, n. 1, p. 12-37, 2018. Disponível em: [https://www.fvj.br/revista/wp-content/uploads/2019/11/2\\_IS\\_20181.pdf](https://www.fvj.br/revista/wp-content/uploads/2019/11/2_IS_20181.pdf). Acesso em: 15 ago. 2024.

SHAMSUDEEN, A.; PALFFY, C. Star anise and oregano essential oil: A comparative evaluation of antibacterial effect. **Journal of Emerging Investigators**, v. 7, p. 1-5, 2024. Disponível em: <https://emerginginvestigators.org/articles/24-066/pdf>. Acesso em: 14 jul. 2024.

SILVA, T. C. *et al.* An Accurate, Affordable, and Precise Resazurin-Based Digital Imaging Colorimetric Assay for the Assessment of Fungicide Sensitivity Status of Fungal Populations. **Agronomy**, v. 13, n. 343, p. 1-19, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/13/2/343>. Acesso em: 04 jul. 2024.

SILVA, E. F. *et al.* Anatomia foliar comparada de *Jatropha gossypifolia* L. (Pinhão Roxo) e *Jatropha curcas* L. (Pinhão Manso). Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82524/1/Pinhao.pdf>. Acesso em: 12 set. 2024.

SILVA, D. P. D.; CARDOSO, M. S.; MACEDO, A. J. Fungos endofíticos como fonte de compostos antibacterianos — um foco em bactérias gram-negativas. **Antibiotics**, v. 11, n. 1509, p. 2-45, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/11/1509>. Acesso em: 29 set. 2024.

SYCHEV, A. V. *et al.* Establishing Compliance Between Spectral, Colourimetric and Photometric Indicators in Resazurin Reduction Test. **Bioengineering**, v. 10, n. 692, p. 1-15, 2023. Disponível em: <file:///C:/Users/gracy/Downloads/bioengineering-10-00962.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2024.

THEVAPALAN, A. ANOVA Test: An In-Depth Guide with Examples. **Datacamp**. 2024. Disponível em: <https://www.datacamp.com/tutorial/anova-test#rdl>. Acesso em: 07 out. 2024.

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

VIANA, A. R. *et al.* PRODUTOS BIOATIVOS NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DO CÂNCER, EM ESPECIAL O MELANOMA. **Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017. Disponível em: <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/view/2388/2099>. Acesso em: 09 set. 2024.

VIRGENS, I. O. *et al.* Revisão: *Jatropha curcas* L.: aspectos morfofisiológicos e químicos. **Braz. J. Food Technol.**, v. 20, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/FDk5q9QjGYRLmmPdTvmsRFG/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 14 set. 2024.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3, 163–175 (2008). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>. Acesso em: 10 mai. 2024.

WITT, N. G. P. M. *et al.* Pinhão-mansô (*Jatropha curcas*) e biodiesel: potencialidades e desafios. **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 13, n. 1, p. 88-109, 2023. Disponível em: <http://www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/477/pdf>. Acesso em: 09 set. 2024.