



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



“Microrganismos endofíticos isolados de *Anacardium humile* associados a óleos essenciais e fibras poliméricas para o tratamento tópico de infecções cutâneas”

Manoela de Araújo Gonçalves

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadores:

Cristina Paiva de Sousa

Daniel Souza Corrêa

Bolsista CAPES - 88887.925106/2023-00

**São Carlos - SP
2025**

Manoela de Araújo Gonçalves

“Microorganismos endofíticos isolados de *Anacardium humile* associado com óleos essenciais e fibras poliméricas para o tratamento tópico de infecções cutâneas”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Prof. Dr. Cristina Paiva de Sousa
Dr. Daniel Souza Corrêa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Manoela de Araújo Gonçalves, realizada em 17/11/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)

Profa. Dra. Elaine Cristina Paris (EMBRAPA)

Prof. Dr. Adilson Cesar Abreu Bernardi (UNIARA)

**Às memórias de Maria do Rosário Guerra Araújo e Enid Alves Gonçalves, sábias
mulheres que conduziram e incentivaram a minha educação e João Marcos
Gonçalves e Leila Cristina de Araújo Gonçalves, que me ajudaram nessa jornada.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leila e João Marcos, por todo apoio, investimento e paciência.

A todos os amigos e colegas que me ajudaram nessa jornada: Larissa de Cássia, Matheus Matos, Luis Fernando Oliveira, Bianca Oliveira, Kelcilene Teodoro, Marcelo Boriollo, Fernanda Rozendo, Gustavo Gonçalves, Camila Sampaio, Amanda Generoso, e muitos outros que também me ajudaram.

Às pessoas que nunca desistiram de mim, Davi Araújo Gonçalves, Matheus Delfino Bueno, Amanda Aparecida Gonçalves, Andressa Baggio, Ellen Gonçalves, Marilene Gonçalves, Valeria Aparecida Araújo e Gabriela Nakamura.

Aos que me ajudaram a evoluir profissionalmente Paulo Andrade, Adilson Bernardi.

Aos meus orientadores Cristina Paiva de Sousa e Daniel Souza Corrêa por toda orientação, paciência e persistência.

À minha psicóloga Elizabeth Thomaz, que me deu forças para continuar.

Aos profissionais da coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia, Claudia Pastega, Anderson Cunha e Cristina Paiva de Sousa.

Aos profissionais atuantes do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar- DMP e aos profissionais da Embrapa instrumentação por toda a ajuda e suporte.

Às tantas pessoas que entraram na minha vida nesse processo: Gustavo Gonçalves, Décio Bueno Neto, Alessandra Delfino, Ariadny Serafim, Vitor Deriggi, Larissa de Cássia e muitos outros que foram importantes nessa jornada.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.925106/2023-00. Agradeço também à EMBRAPA e aos meus orientadores Cristina Paiva de Sousa e Daniel Souza Corrêa.

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 88887.925106/2023-00.

RESUMO

As infecções bacterianas representam um problema de saúde amplamente reconhecido podendo ser desencadeadas por lesões cutâneas superficiais ou profundas. Este cenário, aliado ao crescente número de casos de resistência bacteriana, tem intensificado o interesse na pesquisa de novos antimicrobianos, tanto como opção complementar quanto como formas mais eficientes de aplicação. *Anacardium humile*, planta nativa do cerrado brasileiro e utilizada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, apresenta potencial como fonte de metabólitos bioativos com efeitos antimicrobianos. Os microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas, destacam-se como alternativa promissora ao uso excessivo de antibiótico, por atuarem no controle biológico de fitopatógenos e produzirem metabólitos de interesse biotecnológico. Além disso, a incorporação de compostos bioativos de origem natural em estruturas de fibras sub-micrométricas tem se mostrado relevantes no desenvolvimento de curativos, por possibilitarem a liberação lenta de fármacos, decorrente de sua elevada área superficial, alta porosidade e possibilidade de compor mantas poliméricas capazes de atuarem como curativos. Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a diversidade microbiana endofítica isolada de *Anacardium humile*, com ênfase em seu potencial de controle biológico *in vitro* e na caracterização de enzimas produzidas desses microrganismos, que atuam como produtores de metabólitos secundários, avaliando suas características fisiológicas, morfológicas e suas funções antagonistas. Dos 65 isolados bacterianos, foram observadas atividades enzimáticas amilase (73,8%), celulase (43%), lipase (3%) e esterase (3%), porém, apenas 4 isolados obtiveram halos de inibição relevantes, mas foi identificado apenas 2 isolados apresentaram resultados positivos para as 3 cepas clínicas *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. O gene 16S rDNA de 2 bactérias endofíticas isoladas de *Anacardium humile* foi sequenciado para fins de identificação taxonômica. A análise molecular revelou a presença de 2 espécies bacterianas, sendo eles *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Essas espécies bacterianas foram submetidas a teste de caracterização de curva de crescimento, a fim de avaliar o melhor período de fermentação dos microrganismos endofíticos. Os extratos metabólicos endofíticos foram associados a óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo complementando a ação antagonista contra cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e posteriormente incorporados em mantas de fibras poliméricas produzidas por fiação por sopro em solução. A incorporação dos extratos metabólicos liofilizados de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* associados aos óleos essenciais em mantas de fibras do biopolímero comercial Ecovio F2332, foram produzidas através da técnica de fiação por sopro em solução (SBS). Apesar das mantas apresentarem um halo de inibição menor quando comparado aos extratos metabólicos associados a óleos essenciais, seu uso fez-se necessário uma vez que os extratos apresentaram resultados citotóxicos, o que não foi visto nas mantas poliméricas fiadas, indicando o potencial dessas plataformas para continuidade dos estudos para aplicações em curativos de pele.

Palavras-chave: Endofíticos; Inibição bacteriana; nanotecnologia; óleos essenciais; fibras; fiação por sopro em solução

Abstract

Bacterial infections represent a widely recognized health problem and can be triggered by superficial or deep skin lesions. This scenario, combined with the growing number of cases of bacterial resistance, has intensified interest in research into new antimicrobials, both as complementary options and as more efficient forms of administration. *Anacardium humile*, A plant native to the Brazilian Cerrado and used in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries, it has potential as a source of bioactive metabolites. The microorganisms that inhabit the internal tissues of plants stand out as a promising alternative to the excessive use of antibiotics, as they act in the biological control of phytopathogens and produce metabolites of biotechnological interest. Furthermore, submicron fiber mats have proven relevant in the development of dressings, as they enable the slow release of drugs due to their large surface area and high porosity. In this context, the present study aimed to evaluate the endophytic microbial diversity isolated from *Anacardium humile*, with emphasis on its biological control potential *in vitro* and in the characterization of enzymes produced by these microorganisms, that act as producers of secondary metabolites, evaluating their physiological and morphotintorial characteristics and their antagonistic functions. Of the 65 bacterial isolates, amylase (73.8%), cellulase (43%), lipase (3%) and esterase (3%) enzymatic activities were observed, however, only 4 isolates obtained relevant inhibition halos, but only 2 isolates were identified that presented positive results for the 3 clinical strains. *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*. The 16S rDNA gene of 2 endophytic bacteria isolated from *Anacardium humile* was sequenced for taxonomic identification purposes. Molecular analysis revealed the presence of 2 bacterial species, namely *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. These bacterial species were subjected to a growth curve characterization test to evaluate the best fermentation period for the endophytic microorganisms. The endophytic metabolic extracts were combined with basil, limonene, and clove essential oils, complementing the antagonistic action against strains of *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* and subsequently incorporated into polymeric fiber webs produced by solution blow spinning. The incorporation of lyophilized metabolic extracts of *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* associated with essential oils in fiber sheets of the commercial biopolymer Ecovio F2332, were produced using the solution blow spinning (SBS) technique. Although the sheets presented a smaller inhibition zone when compared to the metabolic extracts associated with essential oils, their use was necessary because the extracts presented cytotoxic results, which was not observed in the spun polymer sheets, indicating the potential of these platforms for further studies for applications in skin dressings.

Keywords: Endophytic; Bacterial inhibition; nanotechnology; essential oils; solution Blow Spinning;

Lista de Abreviaturas e Siglas

BA- *Bacillus amyloliquefaciens*

BS- *Bacillus subtilis*

OL- Óleo Essencial de Limoneno

OM- Óleo Essencial de Manjeriço

OC- Óleo Essencial de Cravo da Índia

CA- *Candida albicans*

EC- *Escherichia coli*

SA- *Staphylococcus aureus*

nm- Nanômetro

DMF- Dimetilformamida

PLA- Poli(ácido láctico)

PBAT- Poli(butileno adipato)-co- (tereftalato)

RPM- Rotação Por Minuto

PBS- Solução Salina Tamponada

TSB- Trypticase Soy Broth

TSA- Trypticase Soy Agar

FTIR- Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

UFC- Unidade Formadora de Colônia

Lista de Figuras:

- Figura 1:** Região onde se alojam os microrganismos endofíticos: endofíticos foliares fúngicos (A) e endofíticos foliares bacterianos (B). Adaptado de (Partida-Martínez and Heil, 2011)..... 21
- Figura 2:** Imagem do cultivo em ágar do macerado da folha onde se observa colônia (flecha) crescidas de endofíticos. Fonte: autor 22
- Figura 3:** Planta *Anacardium humile* (A), flor (B), folha (C) e fruto (D) fonte: Autor (A) e ASCARI *et al.* (2024) (B) (C) (D). 24
- Figura 4:** Localização do bioma Cerrado no Brasil. Fonte: (L. BOLFE, Edson, DINÂMICA AGRÍCOLA NO CERRADO: Análise E Projeções, 2020). 25
- Figura 5:** Representação esquemática das camadas da pele humana, sendo dividida em Epiderme: camada mais externa, Derme: camada intermediária e Hipoderme sendo a camada mais profunda (Mercante, Corrêa et al, 2023). 28
- Figura 6:** (A) Esquema de funcionamento do equipamento de fiação por sopro em solução a) Fonte de gás comprimido, b) Bomba de injeção da solução polimérica, c) regulador de pressão, d) Matriz de fiação de bico concêntrico, e) distância de trabalho e f) Coletor rotativo. Fonte: (Medeiros, Mattoso et al., 2009). (B) Imagem digital (fotografia) do equipamento fiação por sopro em solução. Fonte: autor. 34
- Figura 7:** Estrutura química do PLA. Fonte: (Lasprilla et al, 2012) 35
- Figura 8:** Estrutura química do PBAT. Fonte: (Zhang 2015) 36
- Figura 9:** Amostras da planta *A. humile* no processo de desinfecção superficial. Imersas a álcool 70% (A), hipoclorito de sódio a 2% (B), álcool 70% (C), água destilada (D) e água destilada (E). 39
- Figura 10:** Realização das coletas de folhas e ramos do *A. humile* (A) purificação e caracterização dos endofíticos (B) em halo de inibição (i), caracterização enzimática (ii) e coloração de Gram (iii). Identificação genética (C), curva de crescimento para avaliar fase exponencial e fase estacionária (E) e associação com óleos essenciais de cravo, limoneno e manjeriço (F)..... 44
- Figura 11:** Associação do óleo essencial de cravo (A), limoneno (B), manjeriço (C), cravo e limoneno (D), cravo e manjeriço (E), limoneno e manjeriço (F) e cravo, limoneno e

manjeriço (G) com extrato metabólico de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (i), <i>Bacillus subtilis</i> (ii) e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e <i>B. subtilis</i> (iii).	45
Figura 12: Síntese das mantas de fibras poliméricas produzidas por fiação por sopro em solução, incorporadas aos óleos essenciais e extratos metabólicos (A) e suas caracterizações (B) pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (i), ângulo de contato (ii), FTIR (iii), citotoxicidade (iv) e teste de liberação (v).	51
Figura 13: Características macroscópicas de bactérias endofíticas extraídas de folhas e ramos da planta <i>Anacardium humile</i>	53
Figura 14: Características microscópicas das bactérias endofíticas extraídas de folhas e ramos da planta <i>Anacardium humile</i>	53
Figura 15: Atividade enzimática de bactérias endofíticas extraídas de folhas e ramos da planta <i>Anacardium humile</i>	54
Figura 16: Halo de inibição dos diferentes extratos bacterianos endofíticos isoladas da planta <i>Anacardium humile</i> contra <i>C. albicans</i> , possuindo halos variados entre 10mm e 16mm (A). Contra <i>E. coli</i> , com halos variados entre 11mm a 19mm (B). Contra <i>S. aureus</i> com halos de 9mm (C).	55
Figura 17: Amplificação do DNA dos endofíticos isolados. 1: Amostra <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 2: Amostra <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 3: Amostra <i>Bacillus subtilis</i> / 4: Amostra <i>Bacillus subtilis</i> / C-: controle negativo.....	56
Figura 18: Cinética de crescimento das amostras <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e <i>Bacillus subtilis</i> analisados pelo valor de absorbância em 600 nm versus tempo. A cada 8 horas foi medido a absorbância.	57
Figura 19: Quantificação de unidades formadoras de colônia <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (A) e <i>Bacillus subtilis</i> (B).....	58
Figura 20: Análise estatística da medição do halo de inibição (mm) em função do extrato metabólico de <i>Bacillus subtilis</i> fermentado em 24 horas (Bs24), 48 horas (Bs48), 72 horas (Bs72) e 96 horas (Bs96), extrato metabólico de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> fermentado em 24 horas (Ba24), 48 horas (Ba48), 72 horas (Ba72) e 96 horas (Ba96), extrato metabólico de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> fermentado em 24 horas (BsBa24), 48 horas (BsBa48), 72 horas (BsBa72) e 96 horas (BsBa96), óleo essencial de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM), óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OLOM), óleo essencial de limoneno e cravo (OLOC),	

óleo essencial de manjeriço e cravo (OMOC) e óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OLOMOC), contra cepas de *C. albicans*. 71

Figura 21: : Análise estatística da medição do halo de inibição (mm) em função do extrato metabólico de *Bacillus subtilis* fermentado em 24 horas (Bs24), 48 horas (Bs48), 72 horas (Bs72) e 96 horas (Bs96), extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (Ba24), 48 horas (Ba48), 72 horas (Ba72) e 96 horas (Ba96), extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (BsBa24), 48 horas (BsBa48), 72 horas (BsBa72) e 96 horas (BsBa96), óleo essencial de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM), óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OLOM), óleo essencial de limoneno e cravo (OLOC), óleo essencial de manjeriço e cravo (OMOC) e óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OLOMOC), contra cepas de *E. coli*. 72

Figura 22: Análise estatística da medição do halo de inibição (mm) em função do extrato metabólico de *Bacillus subtilis* fermentado em 24 horas (Bs24), 48 horas (Bs48), 72 horas (Bs72) e 96 horas (Bs96), extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (Ba24), 48 horas (Ba48), 72 horas (Ba72) e 96 horas (Ba96), extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (BsBa24), 48 horas (BsBa48), 72 horas (BsBa72) e 96 horas (BsBa96), óleo essencial de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM), óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OLOM), óleo essencial de limoneno e cravo (OLOC), óleo essencial de manjeriço e cravo (OMOC) e óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OLOMOC), contra cepas de *S. aureus*. 73

Figura 23: Perfis de atividade antimicrobiana por medição de halo de inibição em função do extrato metabólico de *B. subtilis* fermentado em 48 horas (Bs48) associado a óleos essenciais de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM), óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OL+OM), óleo essencial de limoneno e cravo (OL+OC), óleo essencial de manjeriço e cravo (OM+OC), óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OL+OM+OC) contra *C. albicans* A) Perfis de atividade antimicrobiana por medição de halo de inibição em função do extrato metabólico de *B. subtilis* fermentado em 48 horas (Bs48) associado a óleos essenciais de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM) em concentração de 1:1, óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OL+OM), óleo essencial de limoneno e

cravo (OL+OC), óleo essencial de manjeriço e cravo (OM+OC), óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OL+OM+OC) contra *E. coli* B) Perfis de atividade antimicrobiana por medição de halo de inibição em função do extrato metabólico de *B. subtilis* fermentado em 48 horas (Bs48) associado a óleos essenciais de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM) em concentração de 1:1, óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OL+OM), óleo essencial de limoneno e cravo (OL+OC), óleo essencial de manjeriço e cravo (OM+OC), óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OL+OM+OC) contra *S. aureus* C) sendo que médias com a mesma coloração não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1). 74

Figura 24: Perfis de atividade antimicrobiana de medição de halo (mm) por concentrações de óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo associado extrato metabólico de *B. subtilis* (Bs48+EO) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1), contra *C. albicans* (A). Perfis de atividade antimicrobiana de medição de halo (mm) por concentrações de óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo associado extrato metabólico de *B. subtilis* (Bs48+EO) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1), contra *E. coli* (B). Perfis de atividade antimicrobiana de medição de halo (mm) por concentrações de óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo associado extrato metabólico de *B. subtilis* (Bs48+EO) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1), contra *S. aureus* (C). sendo que médias com a mesma coloração não são significativamente diferentes ($p < 0.05$). 76

Figura 25: Imagens das mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo (A). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de limoneno (B). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo e limoneno (C). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo (D). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de limoneno (E). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo e limoneno (F). 77

Figura 26: Óleo essencial de cravo e extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* (A). Óleo essencial de limoneno e extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* (B).

Óleo essencial de cravo e limoneno e extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* (C). Óleo essencial de cravo e extrato metabólico de *Bacillus subtilis* (D). Óleo essencial de limoneno e extrato metabólico de *Bacillus subtilis* (E). Óleo essencial de cravo e limoneno e extrato metabólico de *Bacillus subtilis* (F). 78

Figura 27: Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo, extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens*, polímero Ecovio, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo (OC) à 15% e *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo (OC) à 10% (A). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de limoneno, extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens*, polímero Ecovio, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de limoneno (OL) à 15% e *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de limoneno (OL) à 10% (B). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo e limoneno, extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens*, polímero Ecovio, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo e limoneno (OC + OL) à 15% e *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo e limoneno (OC + OL) à 10% (C). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo, extrato metabólico de *Bacillus subtilis*, polímero Ecovio, *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo (OC) à 15% e *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo (OC) à 10% (D). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de limoneno, extrato metabólico de *Bacillus subtilis*, polímero Ecovio, *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de limoneno (OL) à 15% e *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de limoneno (OL) à 10% (E). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo e limoneno, extrato metabólico de *Bacillus subtilis*, polímero Ecovio, *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo e limoneno (OC + OL) à 15% e *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo e limoneno (OC + OL) à 10% (F)..... 81

Figura 28: Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *B. amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo em 0 segundo e 60 segundos. (A). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *B. amyloliquefaciens* e óleo essencial de limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (B). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *B. amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo e limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (C). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo em 0 segundo e 60 segundos. (D). Ângulo de contato

da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (E). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo e limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (F)..... 83

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Resumo das nanofibras de ECOVIO e parâmetros utilizados.....	47
Tabela 2: Medição de halo da atividade antimicrobiana de extratos metabólicos de bactérias endofíticas, óleos essenciais e associação dos mesmos com atividade antagonista contra cepas clínicas de <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em tempos diferentes.	58
Tabela 3: Atividade antimicrobiana de extrato metabólico de <i>Bacillus subtilis</i> fermentado em 48 horas associado com óleos essenciais antagonísticos a <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	60
Tabela 4: Atividade antimicrobiana de extrato metabólico de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> fermentado em 48 horas associados com óleos essenciais antagonísticos a <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	63
Tabela 5: Atividade antimicrobiana de extrato metabólico de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e <i>B. subtilis</i> fermentado em 48 horas associados com óleos essenciais antagonísticos a <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	68
Tabela 6: Média de halo de inibição de mantas fiadas com Ecovio e extrato metabólico de <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e óleo essencial de cravo e óleo essencial de limoneno.....	84

Sumário:

1 – Introdução	18
2- Revisão Bibliográfica	21
2.1. Endofíticos	21
2.2. <i>Anacardium humile</i>	23
2.1 Biomas do cerrado	25
2.4. Óleos essenciais	26
2.5 Estrutura e fisiologias da pele eudérmica	27
2.6 Tipos de Bactérias e infecções	29
2.7 Principais infecções bacterianas cutânea	30
2.8 Nanotecnologia e Nanomateriais	32
2.9 Nanofibras poliméricas	33
2.10 Fiação por sopro em solução (SBS).....	34
2.12 Polímero Ecovio	35
3. Objetivos	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivos específicos:	37
4. Materiais e métodos:	38
4.1. Realização da coleta.....	38
4.2. Extração, purificação e armazenamento das bactérias.....	38
4.2.1 Caracterização fenotípica.....	40
4.2.2 Caracterização morfotintorial e morfológica	40
4.2.3 Testes enzimáticos	40
4.2.3.1 Atividade celulolítica	41
4.2.3.2. Atividade amilolítica.....	41
4.2.3.3 Atividade pectinolítica.....	41
4.2.3.4 Atividade lipolítica	42
4.2.3.5 Atividade esterase	42
4.2.3.6 Atividade proteolítica	42
4.2.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	42
4.2.5 Curva de crescimento bacteriano	43
4.3 Associação entre extrato metabólico de endofíticos e óleo essencial.....	44
4.4 Extração de DNA bacteriano	45
4.10 Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR.....	46
4.5. Obtenção de nanofibras e encapsulação dos antimicrobianos naturais	46
4.5.1. Preparo das soluções polimérica	46
4.5.2 Fiação por sopro em solução.....	47
4.12 Caracterização.....	48
4.13 Teste de sensibilidade à antimicrobianos com mantas nanofiadas	48
4.14 Teste de citotoxicidade	49

5. Resultados e Discussões	52
5.1. Coloração de Gram	52
5.2. Atividade enzimática	53
5.3. Teste de atividade metabólicas antimicrobianas	54
5.4 Sequenciamento RNA ribossomal 16S	55
5.5 Curva de crescimento bacteriano	56
5.6 Associação entre endofíticos e óleo essencial	58
5.8 Produção de fibras poliméricas contendo ativos	77
5.9 Teste de citotoxicidade	87
6. Conclusão:	89
8. Referências:	90

1 – Introdução

A pele, maior órgão do corpo humano, é formada pela epiderme, que é composta por queratinócitos, desempenhando papel de resistência e proteção, derme, constituída por fibras de colágeno e elastina e hipoderme, composta por tecido adiposo e conjuntivo (Cunha et al, 2020). A pele é uma barreira que delimita o meio interno do meio externo, com numerosas funções, como a proteção contra atrito, estresse mecânico, proteção contra a radiação, contra a desidratação de maneira descontrolada e proteção imunológica contra microrganismos (Yang et al, 2015).

Apesar da pele possuir função de proteção contra microrganismos, é sabido que os microrganismos habitam de maneira natural ambientes extremos, solo, subsolo e entre eles corpo de seres vivos, como o intestino e a parte superficial e superfícies do corpo, mais especificamente na pele, atuando de maneira simbiótica, fornecendo proteção a pele (Cunha et al, 2020). A formação de ferida é originária com o impedimento do órgão de desempenhar seu papel biológico, podendo acontecer por choque físico, químico ou mecânico. A partir das feridas, os microrganismos que atuavam de maneira simbiótica, entram nas lesões e passam a atuar de maneira patogênica (Cunha et al, 2020).

A infecção de pele é um dos maiores desafios de saúde pública global. O método de tratamento mais utilizado é o uso de antibiótico, porém o uso excessivo ou errôneo desse medicamento vem desencadeando problemas tais como catalisar resistência de microrganismos a antibióticos (Yang et al, 2015). Opções alternativas tais como antibióticos naturais vem ganhando destaque por não desencadear efeitos catalizadores em bactérias e conseqüentemente, diminuindo a resistência bacteriana.

Anacardium humile, popularmente conhecida como cajuzinho-do-cerrado, é uma planta medicinal de origem brasileira (de A. royo et al, 2015), encontrada no Cerrado. Este bioma possui uma área de 2,04 milhões de quilômetros quadrados, equivalente a aproximadamente 22 % do território brasileiro, sendo o segundo maior bioma nacional, ultrapassado em área apenas pela Amazônia (de A. royo et al, 2015). Devido a vasta extensão territorial, as plantas do cerrado desenvolvem-se sob a ampla variedade de condições climáticas, altitudes e latitudes características desse bioma. Como conseqüência, o *Anacardium humile* se desenvolve de maneira distinta nas diferentes regiões do cerrado (Santos et al., 2010). As espécies de *Anacardium* spp. são conhecidas por seus efeitos anti-inflamatórios, adstringentes, por suas composições nutricionais, bioatividades e atividades biológicas. O seu fruto é subutilizado, em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas, já que aumentam compostos bioativos,

incluindo flavonoides e vitamina C. (Ferreira et al., 2007; De A Royo et al. 2015). Porém, existe uma escassez de informações científicas sobre os aspectos tecnológicos para o processamento de suas partes constituintes, como casca, polpa, semente, folha, entre outros (Lacava, Azevedo 2013).

O estudo da planta *Anacardium humile* se faz necessário, uma vez que são conhecidos por seus efeitos anti-inflamatório, antibacteriano e antioxidante (Royo et al, 2015). Apesar de todas essas vantagens vistas ordinariamente, as informações e dados científicos do *Anacardium humile* ainda é escasso, principalmente com relação as partes constituintes da planta, como folhas e ramos (Silva et al, 2024).

As plantas abrigam diferentes tipos de microrganismos, dentre os quais se destacam: os fitopatogênicos, que provocam doenças; os epifíticos, que permanecem sobre a superfície vegetal por um período limitado; os microrrizicos, principalmente fungos que vivem associados às raízes; e os endofíticos que mantem uma relação de mutualismo com a planta, beneficiando-se de um ambiente interno mais estável e favorável em comparação ao meio externo (Halmann et al., 1997; Pavlo et al, 2011; Lacava, Azevedo 2013).

Para o crescimento e desenvolvimento das plantas, a literatura descreve que os microrganismos endofíticos, em especial as bactérias são vantajosas, uma vez que são responsáveis pela produção de metabólitos secundários, além de possuírem vantagens ecológicas e com um potencial terapêutico significativo. (Kumar, A. *et al.*, 2024; Moreira; Siqueira, 2006; Soares et 19 al., 2010).

Entre as bactérias endofíticas, destacam-se o gênero de *Bacillus*. Os *Bacillus* são bactérias formadoras de bastonetes, podem ser Gram positiva ou Gram negativa. Eles são uma das principais bactérias encontrada, possuem a capacidade de produzir esporos que garante a sobrevivência da planta mesmo em condições adversa (de A. royo et al, 2015).

Um aspecto adicional que exerce influência significativa sobre a fisiologia e a ecologia vegetal refere-se aos compostos voláteis sintetizados pelas plantas, frequentemente isolados na forma de óleos essenciais. Esses metabólitos desempenham papéis centrais nas interações ecológicas, atuando na defesa contra herbívoros e patógenos, na mediação da comunicação planta-planta, bem como na atração de polinizadores e dispersores de sementes, evidenciando sua relevância tanto para a sobrevivência individual quanto para a dinâmica dos ecossistemas (Negi; Kumar Srivastav; Bala, 2024). São constituídos principalmente por terpenos e são sintetizados em células especializadas, sendo cruciais para a adaptação ambiental.

Os óleos essenciais, amplamente explorados em estudos científicos devido às suas propriedades terapêuticas e composições químicas, são utilizados como dermocosméticos, conservantes naturais de alimentos, controle de pragas, e tem atraído interesse da comunidade farmacêutica devido a propriedades antimicrobianas, antivirais, anticancerígena, antimutagênica e anti-inflamatória, entre outras (Hossein Omidian et al, 2025). Porém, desafios são encontrados na sua aplicação direta devido à alta volatilidade inerente, baixa solubilidade a água e suscetibilidade á degradação ambiental (Achagar et al, 2024).

Em busca de mitigar este problema e buscar formas eficientes de exploração de suas propriedades, a incorporação de óleos essenciais em nanomateriais surge como uma estratégia relevante, capaz de aumentar a eficácia biológica, a biodisponibilidade e a estabilidade do ativo, podendo inclusive promover uma liberação controlada e direcionada (Pezantes-orellana, C. et al. 2024; Gu, 2024; Maddala and Singh, 2024). Além disso, a busca por compostos naturais e biodegradáveis vem se tornando interesse de diferentes áreas de estudos dentro do conceito de saúde e sustentabilidade.

Nanomateriais são objetos que possuem ao menos uma dimensão na escala nanométrica (entre 1 – 100 nm), e propriedades físico-químicas que se diferem significativamente daquelas observadas em seus materiais de partida, e podem apresentar-se sob diferentes morfologias, de acordo com a natureza do material de partida e métodos de síntese (Sanfelice, Pavinatto, Corrêa, 2022). De acordo com a dimensionalidade, os nanomateriais podem ser classificados como 0D, 1D, 2D e 3D (Sanfelice, Pavinatto, Corrêa, 2022; Khan et al,2016). As nanofibras poliméricas, por exemplo, tem sido utilizada na produção de curativos para feridas, entrega controlada para medicamento, filtros de água e ar, tecnologia têxtil, embalagens inteligentes, etc. Elas podem ser compostas por polímeros sintéticos e naturais, e combinadas a materiais inorgânicos (Sk et al, 2025).

Diante do exposto, esta dissertação aborda investigações acerca da incorporação de formulações que combinam óleos essenciais e extratos metabólicos endofíticos do *Anacardium humile* em fibras poliméricas. Esta estratégia revelou-se potencialmente vantajosa para o desenvolvimento de sistemas antimicrobianos voltados às aplicações biomédicas, na área de tratamento de feridas cutâneas, e que podem contribuir no combate a infecções causadas por microrganismos resistentes.

2- Revisão Bibliográfica

2.1. Endofíticos

Existem diversos tipos de microrganismos que colonizam as plantas, como os fitopatogênicos, os epifíticos, micorrizos e os endofíticos (Bell et al, 1995). Os microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que se alojam no interior da planta, exibindo um modo endossimbiótico com a planta, pois o meio interno é mais estável e favorável ao desenvolvimento desta microbiota do que o ambiente externo. (Polesi, Esposito, 2011, Serrano et al., 2021; Purusottam Majhi et al, 2025). Azevedo e Araújo, (2012) classificou os microrganismos endofíticos em 2 grupos, sendo o tipo I referente ao grupo dos que não produzem estruturas externas às plantas, e o tipo II referente aos microrganismos que produz estruturas externas às plantas. Esses microrganismos são fontes de moléculas bioativas e possuem um potencial biotecnológico notável (Purusottam Majhi et al, 2025; Bell et al, 1995).

A penetração dos endofíticos se dá por aberturas naturais ou artificiais, podendo ser pelo estômato, ferimentos causados por instrumentos agrícolas ou pelo atrito das raízes com o solo, entre outros (Peixoto et al. 2004). Após a entrada, os endofíticos podem migrar para outras regiões, alojando-se em diferentes partes das plantas, como folhas, ramos, caules, frutos, sementes, entre outros (Larran 2016). A Figura 1, exemplifica as regiões da folha onde podem ser encontradas bactérias e fungos endofíticos nas plantas. (Malpass et al, 2013)

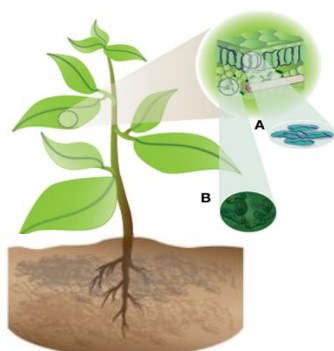


Figura 1: Região onde se alojam os microrganismos endofíticos: endofíticos foliares fúngicos (A) e endofíticos foliares bacterianos (B). Adaptado de (Partida-Martínez and Heil, 2011).

Os endofíticos moldam uma comunidade dentro da planta, exercendo papel significativo sobre a diversidade e a estrutura dos organismos associados às plantas. Dessa forma, desempenham funções de proteção, entre as quais se destaca a produção de metabólitos secundários. Estes compostos, incluem diversas substâncias bioativas, antibióticos e moléculas com atividade contra fitopatógenos, além de produção de fito reguladores que aumentam a resistência das plantas e favorecem a sobrevivência de seu hospedeiro (Alves, et al., 2019; Guimarães et al., 2013; Purusottam, Majhi et al., 2025). Isso ocorre como consequência das plantas a diferentes tipos de estresse, dependendo da região em que se encontram. Esses estresses podem ser bióticos como parasitas, doenças e competição entre plantas, etc (Crawford, et al, 2010) ou abióticos, como luminosidade, acidez do solo, escassez de chuva, altitude, entre outros (Green et al, 2012).

Diversas espécies de bactérias endofíticas tem sido identificada em diferentes tecidos de uma ampla variedade de plantas hospedeiras. Por exemplo, a Figura 2, mostra colônias de bactérias encontradas nas folhas de *Anacardium humile*. Essa diversidade, contribui como forte potencial de produtos naturais, bioativos e químicos para a exploração na medicina, na agricultura e na indústria.

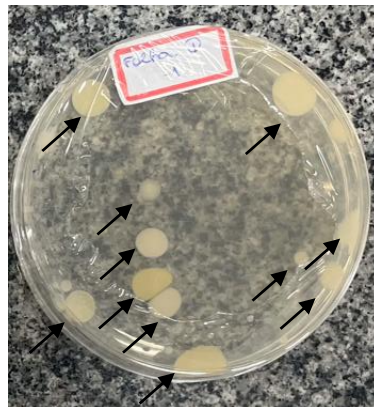


Figura 2: Imagem do cultivo em ágar do macerado da folha onde se observa colônia (flecha) crescidas de endofíticos. Fonte: autor

Vários estudos recentes sobre microrganismos endofíticos têm ganhado destaque devido ao seu potencial antagonista, evidenciado pela capacidade de inibir o crescimento e até causar a morte de bactérias patogênicas. Ogofure e Green (2024) investigaram a bioatividade e o perfil metabólico de extratos brutos de microrganismos endofíticos com finalidade antibacteriana, obtendo resultados promissores. De forma semelhante, Manam et al. (2025) estudaram endofíticos com foco no combate a patógenos bacterianos

humanos, ressaltando seu potencial como candidatos a novos fármacos antimicrobianos. Além disso, Mayila et al. (2024) e Farouk et al. (2023) confirmaram em seus estudos a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos.

2.2. *Anacardium humile*

A planta *Anacardium humile* é popularmente conhecida pelos seus efeitos anti-inflamatório, antibacteriano e antioxidante principalmente em seu fruto e pseudo fruto (Royo et al, 2015). Porém, os estudos sobre suas partes constituintes como folhas e ramos são poucos explorados ainda que possuam inúmeras vantagens (Silva et al, 2024), devido a essa escassez de informações, é de suma importância o desenvolvimento de pesquisas com foco nos seguimentos da planta.

A planta *Anacardium humile*, conhecida como cajuí ou cajuzinho-do-cerrado, compartilha a mesma fisiologia que outras espécies do gênero *Anacardiaceae* (de A. Royo et al, 2015). Suas folhas, simples e perenes, desempenham um papel crucial na absorção de energia luminosa, convertendo-a em energia química na forma de açúcares, desempenhando um papel essencial no processo de fotossíntese (de A. Royo et al, 2015; Menezes Filho, 2020). Além de seu papel na produção de energia, as folhas são reconhecidas na medicina por seu potencial terapêutico como por exemplo, o efeito antiulcerogênica, e no tratamento de lesões de pele, seu efeito antimicrobiano contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* (Ferreira et al, 2010; Pereira et al, 2010).

A casca, utilizada como camada protetora que preserva sua integridade, desempenha um papel fundamental na prevenção da perda de umidade (Evangelista, S. S.; Leão, K. V., 2021). Essa parte da planta também é aproveitada na medicina devido aos benefícios que oferece, incluindo, seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Ferreira et al, 2012).

O fruto, que abriga as sementes conhecidas como nozes, é uma parte da planta frequentemente consumida. Essas sementes não apenas oferecem valor nutricional, mas também apresentam propriedades notáveis, como efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos. Seu consumo se torna, assim, uma prática que vai além do aspecto alimentar, oferecendo potenciais benefícios à saúde (de A. royo et al, 2015).

Adicionalmente, a planta abriga os metabólitos secundários, produzidos a partir de compostos voláteis que incluem ácido fenólico, taninos e flavonoides (Santos et al.,

2023). Esses elementos desempenham um papel crucial na defesa da planta contra predadores e patógenos, destacando a complexidade e a riqueza bioquímica dessa espécie (Santos et al., 2023).

Em resumo, a planta não apenas reflete a fisiologia característica do gênero *Anacardium*, mas também apresenta diversas partes que, longo do tempo, têm sido empregadas tanto na medicina tradicional quanto na alimentação, destacando sua relevância multifacetada (ROYO et al., 2015). Além disso, a planta tem sido testada no tratamento de diversas patologias devido ao seu alto potencial terapêutico (Santos et al., 2023). Seus polifenóis, flavonoides e taninos são conhecidos por suas atividades antioxidante e antiinflamatória. (Morgado et al., 2024). Os testes mais comuns vistos na literatura são os efeitos gastroprotetores, antiulcerogênicos, antidiabéticos, antimicrobiano e cicatrizantes, o que diferencia essa espécie das demais do gênero *Anacardium* (Ferreira et al., 2012). Na Figura 3, é possível observar as estruturas físicas da planta *A. humile*, sendo considerada um subarbusto hermafrodita, com a altura variando entre 0,5 até 2 metros. O seu caule é subterrâneo horizontal, se estendendo de 1 a 5 metros. (Embrapa pantanal, 2025).



Figura 3: Planta *Anacardium humile* (A), flor (B), folha (C) e fruto (D) fonte: Autor (A) e ASCARI *et al.* (2024) (B) (C) (D).

Pesquisas sobre a microbiota associada a essa planta, são fundamentais tanto para o combate a bactérias fitopatogênicas quanto para o conhecimento da biodiversidade microbiana associada principalmente a folhas e ramos do *A. humile*.

2.1 Biomas do cerrado

Produtos naturais podem contribuir de forma significativa para o fornecimento de compostos bioativos, especialmente as plantas e microrganismos, os quais proporcionam substâncias estruturalmente diversificadas, apresentando atividades biológicas, farmacológicas (Newman; Cragg, 2015; Matsumoto e Takahashi, 2017) e biotecnológicas, dentre outras (Bogas et al., 2022).

Cerrado brasileiro é um mosaico de biomas (Batalha, 2011) e apresenta como características plantas endêmicas medicinais de onde microrganismos endofíticos podem ser isolados (Sousa et al., 2017), e que apresentam potencial biotecnológico, tornando o Brasil apto para albergar produtos naturais com aplicações tecnológicas. (Vale et. Al, 2010; Cruz et. al, 2020). Este bioma é considerado um *hotspot*, ou seja, uma região com alta diversidade de espécies, onde a presença de microrganismos endofíticos associados a plantas podem produzir substâncias com interesse diversificado (Noriler et al, 2018).

O *Anacardium humile* pode ser encontrado em uma vasta região territorial ocupado pelo cerrado localizado na Figura 4. Existem variedades de condições climáticas, altitudes e latitudes dessas regiões fazendo com o que o desenvolvimento das plantas seja desenvolvido de maneiras distintas. (Santos, et al., 2010)



Figura 4: Localização do bioma Cerrado no Brasil. Fonte: (L. BOLFE, Edson, DINÂMICA AGRÍCOLA NO CERRADO: Análise E Projeções, 2020).

Em cada região do cerrado onde as plantas crescem e se desenvolvem, ocorrem adaptações específicas em resposta às condições ambientais distintas, como diferenças pluviométricas, de altitude, entre outras características (Noriler et al, 2018). Com isso, as plantas precisam produzir diferentes metabolitos secundários, os quais desempenham um papel fundamental na sua adaptação às condições específicas de cada região (Noriler et

al, 2018). Esses metabolitos são, em grande parte, derivados de compostos voláteis produzidos pelas plantas, também conhecido como óleos essenciais (Asbahani et al, 2015).

2.4. Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos voláteis altamente concentrados e aromáticos, sintetizados por células específicas no interior das plantas, incluindo folhas, caules, sementes, raízes, flores, resinas e cascas. São muito conhecidos pelos seus aromas e diversas atividades biológicas, entre eles os efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidante (Pezantes-Orellana, C. *et al*, 2024). São utilizados em diversas áreas, como alimentos, cosméticos e principalmente medicinais (GU, J.-D., 2024). Os óleos essenciais possuem essas funções devido à sua complexa composição química, frequentemente composta por mais de dezenas de compostos terpênicos diferentes, fornecendo benefícios promissores (Pezantes-Orellana, C. *et al*. 2024; Asbahani et al., 2015).

Os óleos essenciais possuem propriedades que a FDA considera consistente com a definição de medicamento, sendo ele um agente “destinado ao uso no diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doença” (FDA,2014). Eles já são incluídos na composição de muitas formas de dosagem, sendo aplicadas principalmente em ações locais ou inalação (Manion and Widder, 2017; Asbahani et al, 2015).

São extraídos através da destilação a vapor, hidrodifusão ou pressão, dependendo das espécies e localização que é feita a extração. A extração rende pouco material, o que os torna substâncias altamente valiosas (Manion and Widder, 2017; Asbahani et al, 2015). Existem tipos de óleos essenciais que possuem diferentes finalidades, entre eles, óleo extraído da planta *Syzygium aromaticum*, que é conhecido como cravo da Índia, o qual tem sido empregado em aplicações farmacológicas, alimentícias e cosméticas (Ayub, M. *et al.*, 2023). Possui atividades biológicas potentes, como a ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (Tiwari; Dubey, 2022).

Outro tipo de óleo essencial muito conhecido é o da planta *Citrus sinensis*, e que dá origem ao óleo essencial de limoneno. (Seid et al, 2023) Possui uma importância clínica importante pois possui ações antimicrobiológicas contra cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Salmonella typhi* (Poudel & Bhatt, 2024; Ahmed & Mohammed, 2024).

Outro exemplo de óleo essencial é o *Ocimum basilicum* ou manjeriço, que possui os óleos extraídos principalmente das folhas e partes floridas e são principalmente utilizados em indústrias farmacológicas, pois possuem ações antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatória, entre outros (Ale et al, 2023). Esses óleos também possuem ações comprovadas contra bactérias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, pois ela possui a capacidade de romper a membrana celular e interferir no processo bioquímico essencial das bactérias. (Ba-Hamdan et al., 2013; Wirtu et al., 2024).

Lebrazi, et al (2025), investiga ações sinérgicas entre três óleos essenciais para a aplicação antibacteriana e antioxidante, demonstrando em seus estudos eficácia mais forte contra *E. coli* e *S. aureus* com a associação dos óleos. O trabalho de Narayanankutty et al, (2022), investigou o óleo essencial de limoneno, e observou resultados inibitórios contra cepas de *E. coli* com 16,7 milímetros, *S. aureus* com 18,7 milímetros, *P. aeruginosa* com 20,9 milímetros e *S. entérica* com 17,1 milímetros, confirmando a capacidade antibacteriana desses compostos. Segundo Anandakumar et al. (2021) e Ugbogu et al., (2021), os óleos essenciais de limoneno e de manjeriço possuem um efeito altamente bacteriostático.

Além disso, os óleos essenciais, por serem sintetizados biologicamente, possuem em sua composição vários compostos bioativos (Pan et al, 2023). A complexidade desses compostos, permitem que eles penetrem facilmente na membrana celular das bactérias, possuindo diferentes alvos para se alojar e conseqüentemente dificultam o desenvolvimento da resistência bacteriana aos óleos essenciais (Lebrazi et al, 2025).

2.5 Estrutura e fisiologias da pele eudérmica

A pele ou *cúti*s, camada mais externa do corpo, é o manto de revestimento do organismo, o qual desempenha um papel fundamental na defesa contra ameaças externas, regula a temperatura corporal, sintetiza vitamina D, possui função imunológica e de termorregulação, controle hemodinâmico, produção e excreção de metabolitos (Karimi, 2023).

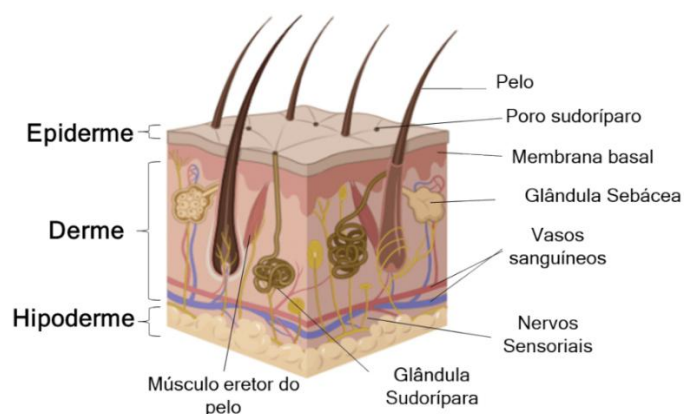


Figura 5: Representação esquemática das camadas da pele humana, sendo dividida em Epiderme: camada mais externa, Derme: camada intermediária e Hipoderme sendo a camada mais profunda (Mercante, Corrêa et al, 2023).

A pele é organizada em três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme, como visto na Figura 5 (Yang et al, 2015). A epiderme é um epitélio escamoso em renovação contínua, com diferentes camadas, recebendo os nomes de germinativa ou basal, espinhosa, granulosa e córnea (Yang et al, 2015).

Na derme, é onde se encontra os vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, terminações nervosas, glândulas sebáceas e sudoríferas e elementos celulares. Ela é dividida em “derme papilar”, na qual é composta por fibras colágenas e elásticas e em “derme reticular” que é composta por feixes colágeno de mistura com fibras elásticas e retilíneas (Cunha et al., 2020).

A hipoderme ou endoderme, é a camada mais profunda da pele, possuindo uma grande quantidade de lipídeo, contém também um pigmento, colesterol, vitaminas e água. O folículo piloso e glândulas sudoríficas se localizam nessa camada da pele (Cunha et al., 2020).

A pele exerce diversas funções, que vão desde funções respiratórias até proteção física (Brito et al, 2024). Existem diversas patologias que podem afetar a derme, incluindo infecções, sendo frequentemente associada à lesões cutâneas (Brito et al, 2024). Os ferimentos, por sua vez, resultam na ruptura da integridade de pele devido a fatores mecânicos externos. Esses processos envolvem a inflamação, formação de tecidos e remodelação (Brito et al., 2024).

Vários microrganismos apresentam a propriedade de se comportarem como ubiqüitários, ou seja, que podem habitar diversos ambientes (May, 2009). Na microbiota normal da pele, são encontradas nas camadas mais superficiais microrganismos como micrococos e corinebacterias, e que são consideradas comensais por não serem patogênicos. Porém, existem também algumas bactérias que possuem potencial patógeno, como exemplo a *S. aureus*. Quando ocorre fissura ou danos na pele, as bactérias podem se estabelecer nesta área, pois encontram maior acesso a nutrientes o que facilita o início de uma infecção cutânea (Mala et al, 2025).

2.6 Tipos de Bactérias e infecções

As bactérias são organismos procariontes, caracterizados por sua estrutura celular simples (Mattos et al.,2013). Pertencentes ao Reino Monera, do gênero *Bacterium*, são os seres vivos mais abundantes no mundo, apresentando uma grande diversidade de espécies, algumas das quais podem ser patogênicas (Mattos et al.,2013), elas apresentam uma notável diversidade, sendo distinguíveis por suas estruturas, composições e arranjos (Tumah et al., 2009).

Esses microrganismos estão amplamente distribuídos, sendo encontrados em diversos ambientes. Algumas bactérias habitam o interior do organismo, desempenhando papel essencial no processo digestivo no trato gastrointestinal (Donini, Í. A. N. et al.,2013). Outras se fixam na superfície da pele humana, enquanto algumas estão presentes no ar, água e até mesmo em ambientes extremamente frios (Donini, Í. A. N. et al.,2013).

É importante destacar que algumas espécies bacterianas, quando em contato com o organismo humano, podem afetar a saúde (Tumah et al., 2009). Devido à sua composição celular simples, as bactérias têm a capacidade de se reproduzir rapidamente, sendo capazes de concluir seu ciclo de multiplicação em apenas 15 minutos (Donini et al.,2013).

Em sua superfície, podem possuir estruturas como flagelos, fimbrias e capsulas. Possuem componentes químicos importantes como ácidos teicoicos, lipopolissacarideo e peptideoglicano na parede celular, as quais são categorizadas em dois tipos principais: aquelas com uma extensa camada de peptidoglicano seguida por uma camada de proteína e a membrana citoplasmática; chamada de Gram positiva ou aquelas com uma camada

mais fina de peptidoglicano protegida por uma membrana externa de lipoproteína chamada de Gram negativa. (Oliveira et al., 2014).

As bactérias são classificadas em aeróbias, ou seja, necessitam de oxigênio para a sua sobrevivência. Esse grupo inclui cocos Gram-positivos, como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e gram-negativos como *Neisseria*. Podem ser também bacilos Gram-positivos como *Kurthia* e *Corynebacterium*, ou Gram-negativos como *Escherichia*, *Enterobacter* e *Salmonella*. Ou ainda podem ser anaeróbicas, ou seja, sobrevivem com pouca ou a ausência de oxigênio, podendo ser cocos ou bacilos gram-positivos e negativos (May, 2009).

A eficácia do tratamento com fármacos antimicrobianos depende, entre outros fatores, da correta identificação do tipo de microrganismos (May, 2009). Para isso, utiliza-se um método colorimétrico padronizado denominado coloração de Gram, que permite classificar as bactérias em Gram positivas ou Gram negativas com base na capacidade de retenção de corantes específicos por suas estruturas celulares (Tumah et al., 2009).

As infecções microbianas são ocasionadas por seres vivos microscópicos como bactérias e fungos. Por serem organismos vivos, esses agentes passam por processos de desenvolvimento, multiplicação, evolução e morte (Mattos, et al., 2013). Esses processos dinâmicos destacam a complexidade das interações entre esses organismos e seus hospedeiros, fornecendo detalhes importantes para a compreensão e tratamento das infecções (Mattos, et al., 2013).

Segundo Wong et al, (2023), a descoberta de novos ativos antibiótico é necessária para auxiliar na atual crise atual de resistência de bactérias a antibióticos. A resistência a antibiótico tem tornado os antibióticos atuais ineficazes, ocasionando mortalidade por infecções (número estimado em até 10 milhões de mortes por ano até 2050). Esse estudo é complementado pelos trabalhos de Cheung, Bae e Otto (2021) e Ahmad-Mansour et al. (2021), que apontam que *Staphylococcus aureus*, um dos principais agentes causadores de morbidade e mortalidade em todo o mundo, tem se tornado cada vez mais desafiador no tratamento de infecções, devido ao aumento de sua resistência a múltiplos fármacos

2.7 Principais infecções bacterianas cutânea

A infecção de pele está entre as doenças infecciosa mais comuns, com um a estimativa de quase 500 casos por 10.000 pessoas por ano (Abrahamian et al., 2019).

Essas infecções variam em gravidade e profundidade, sendo elas, leves quando podem ser tratadas de maneira simples, como o uso de antibiótico ou drenagem superficial, até a necrosante com risco de vida, na qual pode haver uma invasão de tecidos mais profundos, sendo necessária até intervenção cirúrgica (Abrahamian et al., 2019).

As infecções microbianas sempre estiveram entre as principais causas de morte no mundo, o que motivou a busca por tratamentos mais eficazes (Calixto e Cavalheiro, 2012). Neste contexto, a indústria farmacêutica passou a investir no desenvolvimento de fármacos antibacterianos sintéticos (Oliveira et al, 2014). No entanto, há alguns fatores que devem ser seguidos para o uso correto desses medicamentos. A falta de orientação adequada e o uso indiscriminado de antibacterianos favorecem o desenvolvimento de bactérias resistentes, comprometendo a eficácia dos antibióticos disponíveis. (Yang, et al., 2017.)

De acordo com Laube (2004), cerca de 70% da população apresenta pelo menos um problema cutâneo aos 70 anos de idade. Doenças como celulite infecciosa, erisipela, impetigo, foliculite, úlceras e assaduras são observadas tanto em idosos (Laube, 2004) quanto em crianças e recém-nascidos (Brook, 2002). Nestes últimos, o sistema imunológico ainda imaturo torna as infecções mais graves e de difícil controle.

As infecções bacterianas afetam indivíduos de todas as faixas etárias e representam um problema de saúde pública global. Nesses casos, o uso de antibióticos constitui o tratamento padrão. Fármacos como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos são amplamente utilizados como primeira linha terapêutica, por apresentarem amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Brook, 2002).

Entretanto, o uso global de antibióticos aumentou aproximadamente 65% entre 2000 e 2015, relação que, segundo Diallo et al. (2020), é inversamente proporcional à redução das mortes por doenças infecciosas. Esse aumento no consumo tem contribuído significativamente para o surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana, dificultando o manejo clínico das infecções ao restringir o número de agentes terapêuticos eficazes disponíveis (Diallo et al., 2020).

Diante desse cenário, torna-se essencial investigar fontes complementares ou alternativas capazes de reduzir o uso de antibióticos convencionais. Entre essas estratégias, destacam-se fontes naturais com potencial antimicrobiano. Liu et al. (2024) demonstraram o uso de bacteriófagos — vírus que infectam seletivamente bactérias sem afetar células eucarióticas — como agentes terapêuticos promissores. De modo

semelhante, Yadav et al. (2025) avaliaram nanoformulações à base de óleos essenciais com atividade antifúngica. Pan et al. (2022) e Maghfiroh et al. (2025) investigaram as propriedades biológicas de óleos essenciais como substitutos potenciais de antibióticos em rações, destacando sua multifuncionalidade biológica e o menor risco de indução de resistência bacteriana. Esses autores também enfatizam que o uso de nanotecnologia é fundamental para aprimorar o custo-benefício, reduzir odor e volatilidade, além de melhorar a estabilidade e biodisponibilidade dessas formulações. Maghfiroh et al. (2025) ainda demonstraram atividade antimicrobiana significativa contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A biotecnologia tem desempenhado um papel fundamental na promoção da saúde e bem-estar da humanidade, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas recombinantes para doenças bacterianas e virais, conforme abordado por (Garcia et al, 2022

2.8 Nanotecnologia e Nanomateriais

A nanotecnologia é uma ciência que visa o estudo de materiais na nanoescala (Mercante, Corrêa *et al*, 2023). A dimensão nanométrica confere às partículas uma série de propriedades especiais pelo fato de já estarem próximas da dimensão atômico-molecular, na qual se mesclam fenômenos e conceitos da física clássica e quântica (Mercante, Corrêa et al, 2023).

Existem diversos ativos biotecnológicos que podem ser beneficiados pela combinação com processos nanotecnológicos, como a encapsulação, para produção de produtos cosméticos, produtos agrônômicos e até mesmo medicamentos (Mercante, Corrêa et al, 2023).

Sob a perspectiva da dimensionalidade, os nanomateriais podem ser categorizados como 0D, 1D, 2D e 3D. Os nanomateriais de dimensão zero (0D) possuem todas as suas três dimensões na escala nanométrica, englobando exemplos como nanopartículas e pontos quânticos. No caso dos nanomateriais unidimensionais (1D), apenas uma das dimensões ultrapassa a escala nano. Exemplos típicos dessa categoria incluem nanotubos e nanofibras. Os nanomateriais bidimensionais (2D) apresentam somente uma das dimensões na nanoescala como é o caso das nanofolhas, nanoplacas e filmes finos. Já os

materiais 3D são formados por nanoestruturas 0D, 1D e 2D, ou estruturas porosas 3D (Sanfelice, et al, 2022; Mercante, et al.,2023).

2.9 Nanofibras poliméricas

As nanofibras são nanomateriais 1D, possuindo uma alta relação área superficial/volume. Elas são muito utilizadas na ciência biomédica, incluindo em aplicações para liberação controlada de insumos, engenharia de tecidos, curativos para feridas, entre outros (PATHAK, D. *et al.* 2023).

Há vários materiais que podem ser utilizados para a produção das nanofibras incluindo polímeros e seus compósitos (Xu et al, 2025).

Existem diversas técnicas para a produção de nanofibras e, dentre as principais, pode-se citar a fiação por fusão, fiação por sopro em solução, eletrofiação, separação de fases, automontagem, celulose bacteriana e puxamento (Bhatt, et al, 2023).

A eletrofiação é um método amplamente estudado para a produção de nanofibras poliméricas. O método consiste na aplicação de um campo elétrico sobre a gota de uma solução polimérica localizada na extremidade de um capilar. A força de repulsão eletrostática deve superar a força de tensão superficial do líquido para que a gota seja deformada e assim, permitindo que jatos finos eletricamente carregados sejam lançados em direção ao coletor. Neste curso ocorre a secagem do solvente, gerando fibras que são acopladas ao coletor, as fibras produzidas por esse método possuem diâmetros muito pequenos e alta área superficial (Mercante, Corrêa et al., 2023).

(Carvalho et al, 2021), realizou a produção de nanofibras poliméricas obtidas através da eletrofiação, com o objetivo de produzir um curativo via transdérmica visando produção de um anti-inflamatório. Os autores produziram nanofibras eletrofiadas de ECOVIO visando a liberação transdérmica de aceclofenaco para potencializar o tratamento de inflamações e preveniria os efeitos colaterais de aceclofenaco.

Diversos estudos têm explorado a aplicação de Ecovio, principalmente em sistemas de liberação prolongada. Essas soluções poliméricas têm sido associadas a diferentes princípios ativos, com o objetivo de investigar distintos perfis de liberação (Kurečić; Sfiligoj Smole, 2013).

Além disso, há um número crescente de pesquisas envolvendo nanofibras incorporadas a óleos essenciais, como demonstrado por Hayfa Argui et al. (2021), que reportaram propriedades antibacterianas, mecânicas e térmicas relevantes.

Também são encontrados muitos estudos na literatura sobre essa técnica (Mendes et al, 2023), utiliza o equipamento de SBS para obtenção de nanofibras de PLA associada a óleo essencial de hortelã-pimenta para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis. Ou o estudo de (Ozcan et al, 2023), o qual utilizou óleo essencial de misturas de especiarias Sucuk e PLA para a composição da nanofibra que obteve resultados relevantes em ações anti-inflamatórias e antioxidante. Oliveira et al, (2025), fez a incorporação de nanopartículas de prata em caldo fermentativo de *P. polymyxa* incorporados a nanofibras, o que resultou em halos de inibição.

2.10 Fiação por sopro em solução (SBS)

Outro método de produção de nanofibras é a fiação por sopro em solução. Esta técnica proposta em 2009 por Medeiros et al (Medeiros, Mattoso et al., 2009), esse método é considerado uma das técnicas mais viáveis para a produção de nanofibras, o equipamento possui bico concêntrico, bomba de ejeção, uma fonte de ar comprimido e um coletor. O método consiste na aplicação de um fluxo de gás com alta velocidade sobre a gota de uma solução polimérica localizada na extremidade de um capilar. A força do gás diminui a pressão no centro do jato e gera uma força motriz e quando superada a tensão superficial, jatos finos são lançados em direção ao coletor. Neste curso, ocorre a secagem do solvente, gerando fibras que são acopladas ao coletor. A Figura 6, demonstra um esquema do sistema SBS (Medeiros, Mattoso et al., 2009).

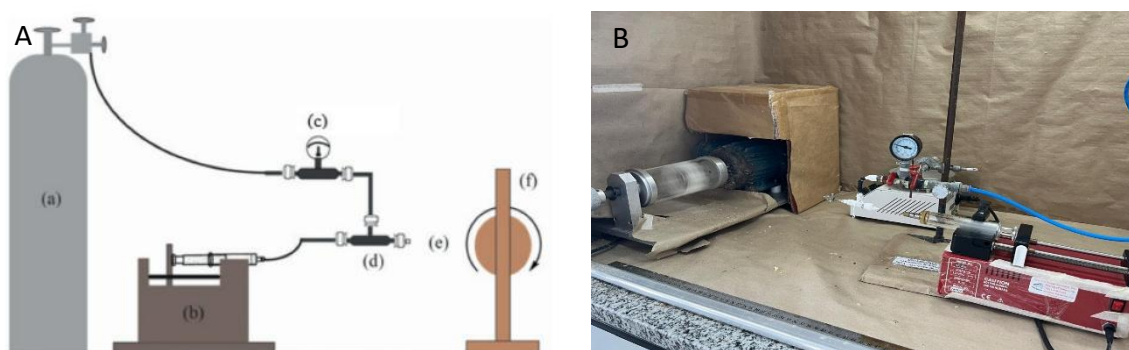


Figura 6: (A) Esquema de funcionamento do equipamento de fiação por sopro em solução a) Fonte de gás comprimido, b) Bomba de injeção da solução polimérica, c) regulador de pressão, d) Matriz de fiação de bico concêntrico, e) distancia de trabalho e f) Coletor rotativo. Fonte: (Medeiros, Mattoso et al., 2009). (B) Imagem digital (fotografia) do equipamento fiação por sopro em solução. Fonte: autor.

Além disso, essa técnica de fiação pode ser composta por diversos tipos de materiais, como os polímeros, polímeros condutores, materiais carbonáceos, materiais 2D, nanopartículas inorgânicas e biomoléculas (Dadol et al,2020). Após a produção da fibra, pode-se modificar a superfície das fibras por diferentes métodos, tanto físicos, como spray, coating, deposição atômica, quanto modificação térmicas calcinando fibras, quanto modificações químicas como a modificação cruzada.

As nanofibras são bastante utilizados para produção de sistema de liberação lenta e controlada, visto que a preocupação exacerbada com o uso de antibiótico é bem atual, tanto para a saúde humana quanto a saúde animal. Nesse contexto, a técnica de fiação por sopro em solução foi escolhida por sua versatilidade na seleção de materiais, como os polímeros, pela otimização do processo e pelas condições favoráveis à aplicação de materiais como os polímeros, pela otimização do processo e pelas condições favoráveis à aplicação cutânea em uso biomédico (Dadol et al, 2020).

As mantas poliméricas possuem diferenciais pois ao imobilizar materiais nas fibras poliméricas, o material é liberado gradativamente e controladamente. O que não é visto em outros sistemas de liberação, como é o exemplo filmes hidrogéis, que são liberados continuamente.

2.12 Polímero Ecovio

O Ecovio é uma blenda polimérica composta por ácido polilático (PLA) e poli (butileno adipato-co-tereftalato; PBAT). Ambos os polímeros são notoriamente utilizados na produção de nanofibras, para aplicações biomédicas, principalmente devido à sua biocompatibilidade, já que combinam propriedades mecânicas com biodegradabilidade (Siegenthaler, KO, Künkel, A., Skupin, G., et al 2011; Carvalho et al, 2021). Na Figura 7 é apresentado a estrutura química do PLA.

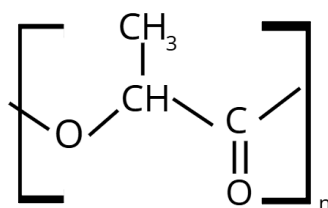


Figura 7: Estrutura química do PLA. Fonte: (Lasprilla et al, 2012)

O PBAT é um poliéster alifático-aromático biodegradável, transparente e com estrutura semi-cristalina. Sua estrutura é composta por uma parte alifática e uma parte aromática, produzindo um material com propriedades físicas e mecânicas satisfatórias (Jiang; Wolcott; Zhang, 2005).

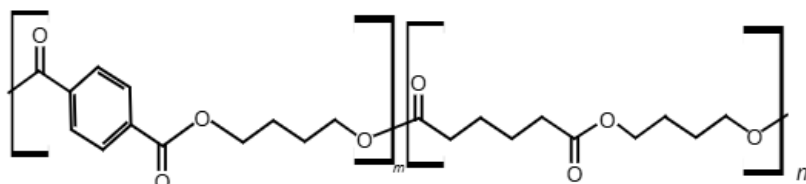


Figura 8: Estrutura química do PBAT. Fonte: (Zhang 2015)

A mistura de PLA e PBAT produz uma matéria prima extremamente versátil, pois a gama de aplicações é muito ampla, indo desde aplicações de filmes como sacolas de compras ou filmes de cobertura vegetal agrícola até redes de malha, filmes retrateis, entre várias outras aplicações (Siegenthaler, KO, Künkel, A., Skupin, G., Yamamoto, M, et al, 2011).

A escolha dos óleos essenciais se baseou na intenção de investigar os efeitos inibitórios de compostos biologicamente ativos, os óleos essenciais selecionados foram o óleo essencial de cravo, devido a sua ampla atividade bacteriana conhecida contra diversos patógenos humanos resistentes a múltiplos medicamentos (Samazer et al, 2021). O óleo essencial de limoneno, é conhecido por exibir forte efeito antibacteriano e antifúngico (Samazer et al, 2021) e o óleo essencial de manjeriço possui um espectro amplo de efeito antibacteriano (Silva et al, 2013)

Logo, a associação dos óleos essenciais com os extratos metabólicos dos *Bacillus* endofíticos encontrados nas plantas de *A. humile*, apresentam grande potencial para o uso complementar a antibióticos, e podem ser implementados em curativos visando diminuir o progresso rápido e constante das resistências bacterianas. Porém, os óleos essenciais possuem algumas desvantagens relevantes como a foto sensibilidade e volatilidade, já os endofíticos possuem um nível de toxicidade na pele humana. Visando diminuir essas desvantagens, a incorporação dos óleos essenciais e extrato metabólicos das bactérias endofíticas em mantas poliméricas se fazem essenciais.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo isolar e caracterizar bactérias endofíticas de *Anacardium humile*, avaliando seu potencial antimicrobiano e sua aplicação, em associação com óleos essenciais, incorporado em mantas de fibras poliméricas obtidas por fiação por sopro em solução, para uso contra patógenos causadores de infecções cutâneas.

3.2. Objetivos específicos:

1. Isolar bactérias endofíticas de folhas e ramos da planta *Anacardium humile* encontradas no Cerrado da UFSCar;
2. Realizar os testes de caracterização *in vitro* dos isolados bacterianos endofíticos para conduzir:
 - a) Testes enzimáticos;
 - b) Testes morfotintoriais e morfológicos;
 - c) Curva de crescimento do endofítico;
 - d) Estudo dos efeitos antimicrobianos contra cepas de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213) e *C. albicans* (ATCC 10231).
3. Identificar e avaliar a diversidade genética das bactérias endofíticas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
4. Incorporar os extratos endofíticos em fibras obtidas por fiação por sopro em solução e composição de mantas antimicrobianas.
5. Caracterizar as fibras quanto à:
 - a) Composição química por espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
 - b) Hidrofilicidade por ângulo de contato;
 - c) Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
 - d) Capacidade de promover teste de liberação prolongada;
 - e) Citotoxicidade.

4. Materiais e métodos:

4.1. Realização da coleta

As amostras vegetais de folhas e ramos de *Anacardium humile* foram coletadas na reserva ambiental do cerrado da Universidade Federal de São Carlos (21° 97' 62'' S, 47° 86' 91'' W). Foi realizada a primeira coleta no mês de janeiro de 2024, pois devido a sua sazonalidade, é o período de frutificação da planta, possuindo maiores produções de metabolitos secundários em seu interior. Foram coletadas 3 plantas com distância de 3 km em média de cada um, utilizando as amostras de folha e ramo.

4.2. Extração, purificação e armazenamento das bactérias

As amostras de folhas e ramos coletadas no Cerrado da UFSCar foram levadas ao Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB/UFSCar). Durante a fase de coleta, selecionaram-se folhas e ramos que não apresentavam nenhum tipo de defeito, como manchas, cortes e abrasões. Em seguida foram lavadas com água corrente para retirar o excesso de poeira e resíduos de solo. Após a lavagem, 12 gramas de amostras (folhas e ramos) foram pesadas para iniciar o processo de desinfecção superficial (Araújo et al., 2014). Para isso, as amostras foram imersas em álcool etílico 70% por 1 minuto, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio diluído a 2% por 30 segundos, álcool 70% por 1 minuto e a água destilada por 1 minuto 2 vezes conforme demonstrado na Figura 9. O último frasco, contendo água esterilizada, foi semeado em meio TSA (Tryptic Soy Agar) para verificar o crescimento de algum contaminante, como os microrganismos epifítico.

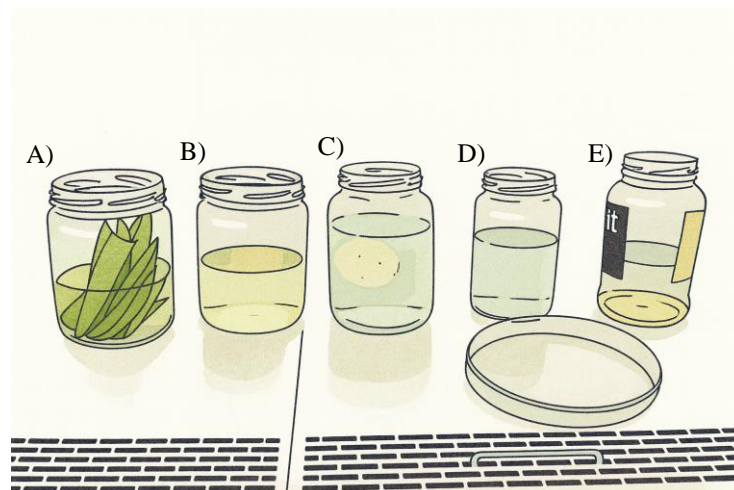


Figura 9: Amostras da planta *A. humile* no processo de desinfecção superficial. Imersas a álcool 70% (A), hipoclorito de sódio a 2% (B), álcool 70% (C), água destilada (D) e água destilada (E).

Após a etapa de desinfecção, as amostras foram cortadas em pequenos fragmentos com bisturi esterilizado retirando as extremidades das folhas e ramos, as quais foram descartadas. Esse processo aumentou a superfície de contato entre os fragmentos e o tampão PBS a 0,9% adicionadas a um tubo tipo Falcon 15 ml. As amostras foram colocadas em uma incubadora com agitação por 2 horas a 180 rpm a 28 °C (Araújo 2014). Após o período de agitação, foi coletada uma alíquota de 100 µl, que foram submetidas a diluição seriada. Nesse processo, foi necessário diluir as amostras das folhas em 0 e -1 e dos ramos em -5 e -6, uma vez que foi possível contabilizar as unidades formadoras de colônias esse processo ocorreu em meio de TSB (Tryptic Soy Broth) com cada cepa individualmente (Himedia). Após esse processo, as diluições foram plaqueadas em triplicata.

As placas foram incubadas por até 15 dias a 28°C na estufa de crescimento, para a verificação de colônias bacterianas isoladas (Araújo, 2014). A contagem padrão em placas dos isolados bacterianos foram realizados, os quais foram purificados através da técnica de esgotamento em placas contendo meio de TSA (Tryptic Soy Agar) e incubadas a 28°C. Foram avaliados os isolamentos das placas de folhas com diluição 0 e -1 e de ramo na diluição -5 devido ao melhor isolamento da colônia. Após a incubação foi feita uma distinção das bactérias, purificando e isolando cada uma delas separadamente (Lima, 2011).

4.2.1 Caracterização fenotípica

Após o isolamento e crescimento das bactérias, elas foram adicionadas no caldo de TSB da marca himedia, e incubadas em estufa por 24 horas a 28°C. Após esse tempo, uma turvação das amostras foi observada devido à proliferação dos microrganismos os quais foram adicionados com glicerol puro em microtubos de 1,5 mL, na proporção de 1:1 e congeladas a -80°C. Para a utilização das bactérias armazenadas, elas passaram pelo processo de reativação. Para isso, os microtubos foram descongelados em temperatura ambiente, semeadas em placas e armazenadas na estufa a 28°C de 24 a 48 horas.

4.2.2 Caracterização morfotintorial e morfológica

Os isolados bacterianos foram submetidos a substrato para identificar caracterização de enzimas específicas, de forma visual, e a morfologia das colônias foi observada, quanto ao seu tamanho, coloração e forma na placa. A coloração de Gram foi feita com o objetivo de avaliar e classificar microbiologicamente as bactérias isoladas endofíticas que passou pelo seguinte protocolo de coloração: inicialmente, corou-se com violeta de genciana por 1 minuto, seguido de lavagem com água destilada. Em seguida, o esfregaço foi tratado com solução lugol por 30 segundos e lavado novamente com água destilada. Posteriormente, realizou-se a descoloração com álcool etílico a 95%, seguida de nova lavagem com água destilada. Por fim, foi aplicada a fucsina como corante de contraste, e após a última lavagem com água destilada, procedeu-se á observação microscópica (Rand and Tillan, 2006).

4.2.3 Testes enzimáticos

As bactérias endofíticas foram submetidas a testes enzimáticos, e avaliados qualitativamente. Esses testes foram conduzidos em placas de Petri após inocular as unidades formadoras de colônia dos endofíticos crescido no meio de TSA (Araújo et al., 2014).

Esses testes foram importantes para verificar a capacidade dos endofíticos de produzir as enzimas amilase, celulase, protease, pectinase pH 5, pectinase pH 8, lipase e esterase. Foram considerados positivos os testes nos quais as amostras que geraram a formação de halo em torno da colônia (Araújo et al., 2014).

4.2.3.1 Atividade celulolítica

Os isolados foram cultivados em meio de cultura em meio mínimo M9, que é composto por 200 mL de solução estoque contendo 64g.L⁻¹ de fosfato dissodico (Na₂HPO₄.7H₂O); 15g.L⁻¹ de dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄); 2,5g.L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) ; 5g.L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl), com carboximetilcelulose como fonte de carbono, incubado a 28°C durante 48 horas (Teather; Wood et al., 1982).

Após o crescimento dos endofíticos, foi adicionado 10 mL de corante vermelho Congo deixado em repouso por 15 minutos. Após isso, as placas foram lavadas com NaCl por 5 minutos. Após essa lavagem, foi feita a leitura em que a formação de um halo amarelado, alaranjado indica a presença da produção de celulase pelos endofíticos, já a não formação de halo indica a ausência de produção da celulase pelos endofíticos (Teather; Wood, et al., 1982).

4.2.3.2. Atividade amilolítica

Os isolados foram cultivados em meio mínimo M9 contendo 200 mL de solução contendo 64g.L⁻¹ de fosfato dissodico (Na₂HPO₄.7H₂O) ; 15g.L⁻¹ de dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄); 2,5g.L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) ; 5g.L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl), 2mL de sulfato de magnésio (MgSO₄) 1M; 0,1mL de CaCl₂ 1M, 10g.L⁻¹ de glicose e 15g.L⁻¹ de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel. As amostras foram incubadas a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento, foi adicionado 10 mL de solução de iodo e lavados com água corrente. A presença de um halo incolor indicou a produção de amilase. (Hankin; Anagnostakis, 1975; Teather; Wood, 1982).;

4.2.3.3 Atividade pectinolítica

Os isolados foram cultivados em meio mínimo M9, que é composto por 200 mL de solução estoque contendo 64g. L⁻¹ de fosfato dissodico (Na₂HPO₄.7H₂O); 15g. L⁻¹ de dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄); 2,5g L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl); 5g. L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl), com pectina como fonte de carbono. Foi observada ação pectinolítica em diferentes pH, portanto, foi ajustado o pH de 5 e 8 e incubados a 28°C durante 48 horas.

Após o crescimento dos endofíticos, foi adicionado lugol e o conjunto lavado com água corrente. Para a visualização dos resultados, é necessário observar a presença de halos incolores, que indicam a presença de produção da pectinase pelos endofíticos (Teather; Wood, 1982).

4.2.3.4 Atividade lipolítica

As bactérias endofíticas foram cultivadas em meio de cultura lipase e esterase contendo: 10g.L⁻¹ de Peptona 5g.L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) ; 0,1g.L⁻¹ de cloreto de cálcio (CaCl₂. 2H₂O) e 15 mg.L⁻¹ de agar (agar/agar) ajustando o ph para 7,0. Após a esterilização do meio de cultura, foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20. A formação de um halo claro ao redor da colônia indica a presença de esterase e a formação de um halo com cristais indica a presença de lipase (Teather; Wood, 1982).

4.2.3.5 Atividade esterase

As bactérias endofíticas foram cultivadas em meio de cultura lipase e esterase contendo: 10g/L de Peptona 5g/L de cloreto de sódio (NaCl) ; 0,1g/L de cloreto de cálcio (CaCl₂. 2H₂O) e 15 mg.L⁻¹ de agar (agar/agar) ajustando o pH para 7,0. Após a esterilização do meio de cultura, foi adicionado 1% (v/v) de Tween 80. A formação de um halo claro ao redor da colônia indica a presença de esterase (Teather; Wood, 1982).

4.2.3.6 Atividade proteolítica

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura Protease contendo: 5g.L⁻¹ de triptona; 2,5g.L⁻¹ de extrato de levedura; 1g.L⁻¹ de glicose, 2,5 g.L⁻¹ de NaCl e 15g.L⁻¹ de agar (agar/agar) 10 ajustando o pH para 7,0. Após a esterilização adicionou-se 100 mL de leite desnatado 0% gordura. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo de degradação ao redor da colônia indica a presença de protease (Hankin; Anagnostakis, 1975).

4.2.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi testada utilizando ensaios biológicos qualitativos, em triplicata. Os microrganismos utilizados com potencial patogênico foram *C. albicans* (ATCC 10231), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213).

Para que esse teste fosse realizado, foi utilizado a técnica de difusão em poço, dos extratos dos isolados endofíticos. As bactérias foram submetidas a incubação a 37°C por 24 horas em meio líquido de TSB ajustadas nas concentrações ideais de acordo com a escala de MacFarland (Montero Recalde et al, 2021). Para a obtenção dos extratos metabólicos, as bactérias fermentadas foram centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm e a posteriori filtradas. As bactérias foram semeadas (100 µL) em placas de Petri contendo o meio Mueller Hinton (MH) com o espalhamento com a alça de Drigalsky. Foram colocados 100 µL dos extratos de metabólicos dos endofíticos inoculados em poços. As placas foram mantidas a 37°C por 24 horas. E foi avaliada pela formação do halo de inibição em triplicata.

4.2.5 Curva de crescimento bacteriano

Após a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foram selecionadas as bactérias que produziram os maiores halo de inibição contra as três cepas clínicas estudadas e sequenciadas geneticamente. Segundo o sequenciamento, foram isoladas as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*.

Primeiramente, foi adicionado 100 µl do inóculo no caldo de crescimento ISP2, permanecendo em torno de 48h. Esse inóculo foi despejada no tubo Falcon e centrifugadas em 4.000 rpm a 20 minutos. Esse método foi repetido 3 vezes, descartando o sobrenadante e ressuspensando em solução salina 0.85%, sendo que na última lavagem, foi ressuspensada em 10 mL de ISP2, sendo esse o inóculo (Masoodi, Khalid Z, *et al*, 2021).

A absorbância dos inóculos foi monitorada no espectrofotômetro visível em 600 nm. Após a leitura, foi adicionado 40 mL de inóculo em 360 mL de meio ISP2, totalizando 400 ml. Essa amostra, foi distribuída de maneira homogênea em 5 Erlenmeyers para diminuir a chance de contaminação durante o teste. Essas amostras foram agitadas a 28 °C a 120 rpm (Masoodi, Khalid Z. *et al.*, 2021).

A cada 8 horas a absorbância das amostras em 600 nm foi monitorada e em paralelo foi feito o teste de diluição seriada, em que foram plaqueadas as diluições -4, -5 e -6 para observação do crescimento bacteriano (Huang, Lihan, 2016). Além disso, foi

feito os testes de antimicrobianos medindo o halo de inibição a cada 8 horas (Masoodi, Khalid Z, *et al*, 2021).

A Figura 10, ilustra os procedimentos anteriormente descritos, e que incluem coleta da planta no bioma Cerrado da UFSCar, seguido do processo de assepsia externa de folhas e ramos para garantir obtenção exclusiva de microrganismos endofíticos, os quais foram cultivados e purificados até que sua individualidade estivesse concluída. Foram caracterizados quanto seus aspectos morfológicos, morfotintoriais, ação antagonista a patógenos causadores de infecções cutâneas e perfil enzimático. As bactérias endofíticas que foram identificadas geneticamente, foi avaliado sua curva de crescimento a fim de definir o tempo de fermentação adequado para a produção do extrato metabólico. Em seguida, os extratos metabólicos foram associados a óleos essenciais de cravo, limoneno e manjeriço.

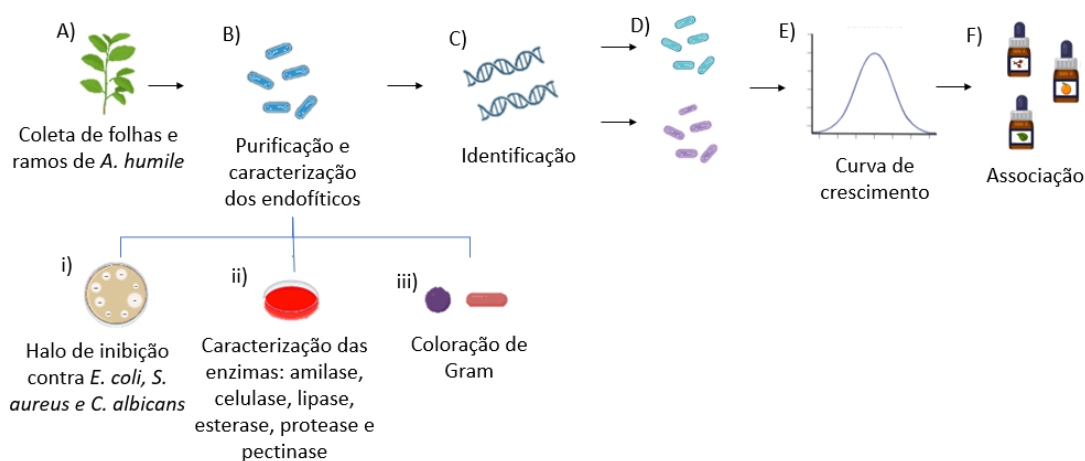


Figura 10: Realização das coletas de folhas e ramos do *A. humile* (A) purificação e caracterização dos endofíticos (B) em halo de inibição (i), caracterização enzimática (ii) e coloração de Gram (iii). Identificação genética (C), curva de crescimento para avaliar fase exponencial e fase estacionária (E) e associação com óleos essenciais de cravo, limoneno e manjeriço (F).

4.3 Associação entre extrato metabólico de endofíticos e óleo essencial

Através dos resultados de halo de inibição e curva de crescimento, foram feitos testes de associação com os extratos metabólicos com óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo. Essa associação, fez-se necessária uma vez que houve a melhora do potencial antagonista. Além da associação, foi feito um estudo variando as concentrações dos óleos essenciais, possuindo porcentagens de: 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,55% e 0,78%. Além disso, também foram avaliadas as diferentes fermentações de extrato metabólico, sendo elas em 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas conforme demonstrado na Figura

11. Essas concentrações foram determinadas a partir da concentração inibitória mínima, em que não afetou de maneira direta o crescimento endofítico e nem sua composição metabólica.




	A)	B)	C)	D)	E)	F)	G)
i) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 	X	X	X	X	X	X	X
ii) <i>Bacillus subtilis</i> 	X	X	X	X	X	X	X
iii) <i>B. amyloliquefaciens</i> + <i>B. subtilis</i> 	X	X	X	X	X	X	X

Figura 11: Associação do óleo essencial de cravo (A), limoneno (B), manjericão (C), cravo e limoneno (D), cravo e manjericão (E), limoneno e manjericão (F) e cravo, limoneno e manjericão (G) com extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* (i), *Bacillus subtilis* (ii) e *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. subtilis* (iii).

4.4 Extração de DNA bacteriano

As bactérias endofíticas que obtiveram resultados promissores enzimático e de halo, foram submetidas à extração de DNA. Para isso, as colônias bacterianas foram cultivadas em tubos com TSB a 28 °C por 48 horas sob agitação constante a 150 rpm. Após a centrifugação das culturas por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi utilizado para a análise. Os DNAs dos isolados foram extraídos com o uso do kit de extração da Cellco, *Bacteria DNA preparation kit, spin column based genomic DNA purification from bactéria* (Cellco, Alemanha).

Primeiramente, foi coletado 1 mL de caldo TSB contendo o microrganismo, centrifugado (10.000 rpm por 2 minutos), descartado o sobrenadante e agitado vigorosamente por 1 minuto. Após, foi adicionado 50 µL de mix de enzimas (kit da Cellco) e agitado por 50 segundos, incubando-se a 37 °C por 10 minutos. Adicionou-se a seguir 300 µL de tampão e 8 µL de protease k, incubando-se a 60°C por 5 minutos. Para ter a ligação de DNA, foram adicionados 300 µl de *binding buffer* e agitou-se, colocando no gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos (CELLCO, Alemanha).

Paralelamente, foi feita a ativação da coluna, adicionando 100 µl de *buffer* de ativação, centrifugado por 30 segundos e descartado o sobrenadante (Cellco, Alemanha).

O carregamento do DNA foi realizado adicionando o sobrenadante da amostra para um tubo limpo, adicionando-se 200 µL de álcool a 98% e adicionou-se essa amostra na coluna já ativada. Centrifugou-se por 2 minutos a 10.000 RPM e o sobrenadante foi descartado. Após isso, lavou-se 2 vezes com água destilada, centrifugou-se por 30 segundos a 10.000 rpm o sobrenadante foi descartado. O produto foi adicionado a um microtubo de 1,5 mL e descartou-se a coluna (Cellco, Alemanha).

4.10 Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR

A amplificação do gene 16S rDNA dos isolados foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador programado para a desnaturação inicial de cinco minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão no final de cinco minutos a 72°C finalizando com 4°C para a conservação de DNA. (Chakravorty et al., 2007).

O gel foi preparado com 1% de agarose em sua composição e 30 mL de tampão TAE diluído. O controle foi observado através do *ladder*. Foi feito um mix com o *gelred* que coloriu a amostra em contato com a luz UV e de *buffer* de carregamento, responsável por carregar a amostra na proporção de 1:2. Após isso, as amostras foram adicionadas no mix separadas e colocadas na cuba de eletroforese, onde a amostra foi submetida a uma carga de 60v em 30 minutos de corrida. Foi adicionado o gel ao fotodocumentador para verificar os resultados obtidos. (Chakravorty et al., 2007)

4.5. Obtenção de nanofibras e encapsulação dos antimicrobianos naturais

4.5.1. Preparo das soluções polimérica

Para a produção das fibras, utilizou-se o polímero Ecovio F2332, fornecido pela empresa BASF. Esse material é composto por uma mistura de poli(ácido láctico) (PLA) e poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT), contendo aproximadamente 55% de PLA e 45% de PBAT. Para a solubilização do polímero, foram utilizados os solventes clorofórmio juntamente com Dimetilformamida (DMF). A solução polimérica foi

composta por 10% e 15% de extrato metabólico dos endofíticos juntamente de óleos essenciais. Foram preparadas e agitadas por 2 horas para boa solubilização do polímero.

A solução polimérica foi fiada no equipamento de fiação por sopro em solução no LNNA da (EMBRAPA) instrumentação.

4.5.2 Fiação por sopro em solução

Para a produção das nanofibras, primeiramente foi preparada uma solução polimérica, contendo 10% de polímero Ecovio, fornecido pela empresa BASFT, com solvente de clorofórmio e DMF, juntamente com variações de 10% e 15% do princípio ativo que é a junção de extrato metabólico endofítico com óleos essenciais de limoneno e cravo.

As condições experimentais usadas foram: taxa de injeção de 7,5 mL/h, pressão de 2 bar, distância do coletor de 35 cm para a produção das nanofibras de ECOVIO com

Amostra*	Concentração extrato (m/m)	Óleos essenciais (m/m)	Polímero (m/m)	Taxa de injeção (mL/h)	Pressão (bar)	Distância da agulha ao coletor (cm)
BA + OC	8,75%	1,25%	10%	7,5	2	35
	14,7%	1,87%	10%	7,5	2	35
BA + OL	8,75%	1,25%	10%	7,5	2	35
	14,7%	1,87%	10%	7,5	2	35
BA + OC+ OL	8,75%	1,25%	10%	7,5	2	35
	14,7%	1,87%	10%	7,5	2	35
BS + OC	8,75%	1,25%	10%	7,5	2	35
	14,7%	1,87%	10%	7,5	2	35
BS + OL	8,75%	1,25%	10%	7,5	2	35
	14,7%	1,87%	10%	7,5	2	35
BS + OC+ OL	8,75%	1,25%	10%	7,5	2	35
	14,7%	1,87%	10%	7,5	2	35
BA + BS + OC+ OL	8,75%	1,25%	10%	7,5	2	40
	14,7%	1,87%	10%	9,5	2	35

diferentes princípios ativos.

Tabela 1: Resumo das nanofibras de ECOVIO e parâmetros utilizados.

* “BS” representa o extrato metabólico do *Bacillus subtilis*, “BA” é a representação do extrato *Bacillus amyloliquefaciens*, “OC” é o óleo essencial de cravo e “OL” representa o óleo essencial de limoneno.

4.12 Caracterização

As propriedades físico-químicas, térmicas e morfológicas das fibras foram avaliadas. A composição química e identificação de grupos funcionais foi realizada pela técnica de espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), usando um espectrofotômetro Bruker (Vertex 70), com módulo de Referência Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, de 4000 a 400 cm^{-1} em resolução de 4 cm^{-1} e varredura de 32 scans.

A morfologia das fibras foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando um microscópio JEOL JSM-6701F. Amostras das mantas foram cortadas e anexadas aos porta-amostras de alumínio utilizando fita de carbono e recoberta com outro por meio de um metalizadora (Leica- SCD 050).

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento TA (Q500 series). Foi utilizado balança de platina com taxa de aquecimento de 30°C. min^{-1} até 700°C. min^{-1} em atmosfera de nitrogênio com vazão de 10°C. min^{-1} .

O ângulo de contato foi medido pelo equipamento tensiômetro (KSV Instrument) equipado com uma câmera CCD (KGV-5000) para investigar a hidrofobicidade das mantas poliméricas. Para essa análise, foi colocado aproximadamente 10 μL de água gotejando na superfície da manta de nanofibras e as imagens foram coletadas durante 60 segundos.

4.13 Teste de sensibilidade à antimicrobianos com mantas nanofibradas

As atividades antimicrobianas das mantas produzidas foram analisadas pelo teste de sensibilidade de antimicrobiano por disco-difusão. Foram utilizadas cepas de *C. albicans* (ATCC 10231), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213).

Para que esse teste fosse realizado, foi utilizado os discos das mantas poliméricas cortadas com diâmetro de 6 mm com a incorporação dos extratos metabólicos associados aos óleos essenciais. As bactérias foram submetidas a incubação a 37°C por 24 horas em meio líquido de TSB ajustadas nas concentrações ideais de acordo com a escala de MacFarland (Montero Recalde et al, 2021). Para a obtenção dos extratos metabólicos, as bactérias fermentadas foram centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm e a posteriori filtradas. As bactérias foram semeadas (100 μL) em placas de Petri contendo o meio Mueller Hinton (MH) com o espalhamento com a alça de Drigalsky e em seguida, foi

alojado as mantas poliméricas. As placas foram mantidas a 37°C por 24 horas. E foi avaliada pela formação do halo de inibição em triplicata.

4.14 Teste de citotoxicidade

4.14.a) Cultivo celular

Foram utilizados fibroblastos humanos da linhagem HDFn (*Primary Dermal Fibroblast Normal; Human, Neonatal* (HDFn), n.d.). As células foram cultivadas em garrafas médias de cultura em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-ALDRICH, USA) na presença de antibióticos penicilina/streptomina a 100 µl/mL (LGC Biotechnology) com adição de 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (LGC Biotechnology). As garrafas foram mantidas incubadas em ambiente úmido a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem 90% de confluência, sob passagens. (Green et al., 1982)

4.14.b) Metabolismo celular via função mitocondrial

O método colorimétrico de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo (MTT;SIGMA-ALDRICH, EUA) foi aplicado para elucidar o metabolismo celular. O teste envolve a medição da formação de cristais de formazan por enzimas mitocondriais, onde uma maior produção desses cristais indica maior absorvância e um maior grau de homeostase celular (Mosmann, 1983). As células foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em um volume final de 200 µL em uma placa de 96 poços. Após a adesão celular em 24 horas, foram adicionados 100 µL de cultivo e co cultivo, sendo eles os extratos metabólicos de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* e a associação entre os extratos metabólicos de ambos os endofíticos, óleos essenciais e mantas poliméricas em cada poço inicial e suas diluições nos demais poços. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X (solução salina tamponada com fosfato 10X: 8 g de NaCl, 2 g de KCl, 11,5 g de Na₂HPO₄, 2 g de KH₂PO₄ e 1 L de água destilada) e foram adicionados 100 µL por poço de solução de MTT a 0,5 mg/mL (diluída em PBS 1X mais meio incompleto sem fenol (1:5)). A reação ocorreu por 4 horas em uma câmara úmida a 37°C e 5% de CO₂ (condições padrão de cultura). Controles branco contendo apenas a solução de MTT foram preparados. A solução

reagente foi então removida, e 100 µL de diluente de DMSO por poço foram adicionados, seguidos pela leitura da absorbância a 570 nm em um espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). A porcentagem de metabolismo celular foi calculada de acordo com a equação 1: valor individual ÷ valor médio do grupo CTRL × 100.

$$\% \text{ citotoxicidade} = \frac{\text{Grupo experimental} \times 100}{\text{Média do grupo CTRL}}$$

4.14c) Produção de Óxido Nítrico (ON) pela Reação de Griess

A produção de óxido nítrico (ON) foi medida usando a reação de Griess, que detecta os níveis do íon nitrito (NO_2^-) ao reagir o nitrito com sulfanilamida em um meio ácido. O composto diazo resultante então reage com o dicloridrato de N-(1-naftiletilenodiamina; NED), formando um composto de coloração vermelha (Green et al., 1982; Saltzman, 1954). Em microplaca de 96 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas 1×10^4 células por poço. Posteriormente, após 24 horas de adesão, foram adicionados por poço 100 µL de meio completo e 100 µl de cada co-cultivos *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*, extratos e membranas e suas diluições foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 horas, 100 µl do sobrenadante foram coletados e adicionados a uma nova placa, seguido da adição de 100 µl da solução de Griess (mistura 1:1 da solução A [sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%] e solução B [0,1% de dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina]) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). A concentração de nitrito no sobrenadante foi quantificada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito em mM descritas no kit.

A Figura 12, demonstra resumidamente a síntese das mantas de fibras poliméricas, e caracterizações físico-químicas realizadas, como descrito anteriormente.

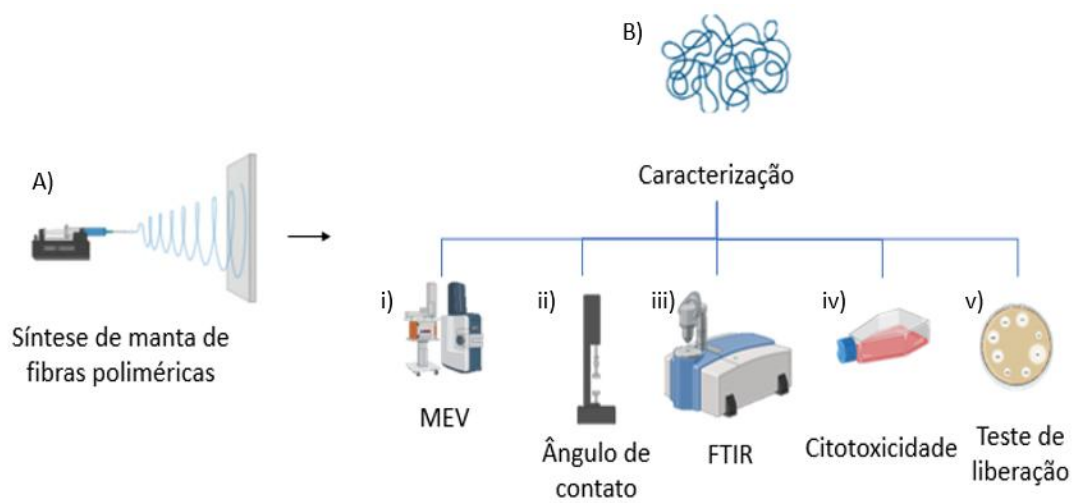


Figura 12: Síntese das mantas de fibras poliméricas produzidas por fiação por sopro em solução, incorporadas aos óleos essenciais e extratos metabólicos (A) e suas caracterizações (B) pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (i), ângulo de contato (ii), FTIR (iii), citotoxicidade (iv) e teste de liberação (v).

5. Resultados e Discussões

5.1. Coloração de Gram

Após coletar as plantas no cerrado, foi feito o plaqueamento diluído das amostras (folhas e ramos). Essas diluições permitiram a visualização de diferentes bactérias obtidas nas diferentes partes das plantas. Com os crescimentos bacterianos nas placas, as amostras, foram submetidas ao processo de estriamento em placa, para que cada bactéria fosse isolada. A partir das bactérias endofíticas isoladas, foram obtidas 37 bactérias nas folhas e 28 nos ramos, totalizando 65 bactérias.

Através da coloração de Gram, foi possível observar as características morfológicas de cada estrutura das bactérias endofíticas coletadas de folhas e ramos. Dos microrganismos identificados, observamos presença de bacilos Gram-negativos, totalizando 11 indivíduos, além de uma predominância de bacilos Gram-positivos, contabilizando 52 isolados, e a presença de cocos Gram-positivos, totalizando 2 indivíduos.

Conforme visualizado na Figura 13, as características fenotípicas indicam diferentes tamanhos, com resultado de 19 bactérias com UFC grandes. Dessas 19, 14 são de folhas e 5 são de ramos. Possui um total de 18 UFC de tamanho médio, com 7 sendo de folhas e 11 de ramos e de tamanho pequeno possuiu 28 UFC, 16 de folhas e 12 de ramos. Já na coloração das UFCs, foram observadas 3 diferentes cores: amarela, com 15 de folhas e 13 de ramos, com um total de 28, branca, sendo 9 de folhas e 8 de ramos e transparente com 13 de folhas e 7 de ramos. As amostras apresentaram forma circular, 22 em folhas e 11 em ramos e forma irregular com 15 em folhas e 17 em ramos.

As colônias foram definidas em grandes, as que possuíram diâmetro a partir de 13 cm, médias que possuíram diâmetro entre 9 a 12 cm e pequenas, as colônias que apresentaram diâmetro de até 8 cm.

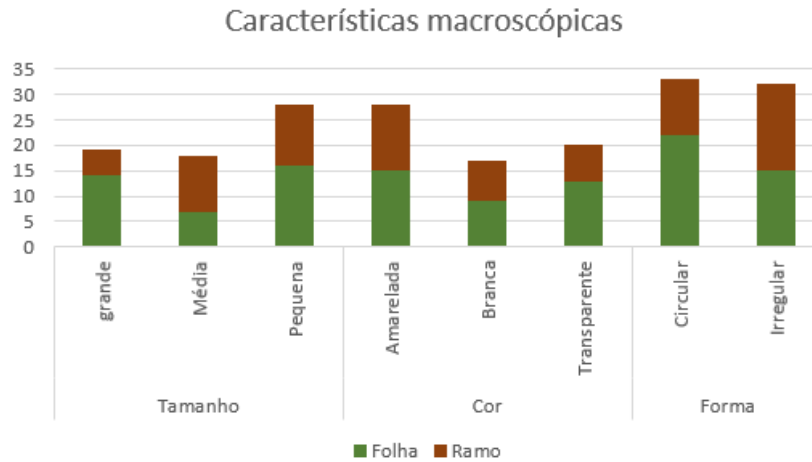


Figura 13: Características macroscópicas de bactérias endofíticas extraídas de folhas e ramos da planta *Anacardium humile*.

Já na Figura 14, é possível observar as características morfotintoriais dessas mesmas bactérias. Foi avaliado a coloração dessas bactérias, as quais possuíram 18 Gram positivas para folhas e 27 Gram positivas para ramos. Foi avaliado também a estrutura dessas bactérias em bacilos e cocos, os quais possuem 37 bacilos em folhas e 26 em ramos e não foi visto cocos nas folhas e apenas 2 endofíticos extraídos do ramo da planta.

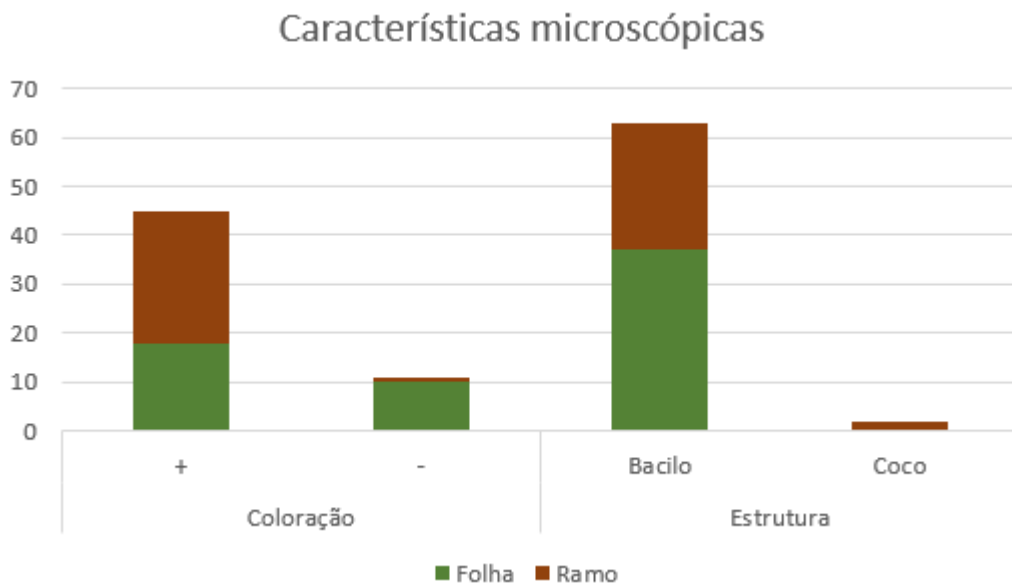


Figura 14: Características microscópicas das bactérias endofíticas extraídas de folhas e ramos da planta *Anacardium humile*.

5.2. Atividade enzimática

As bactérias isoladas foram submetidas a análise de atividade enzimática. Na Figura 15, é possível avaliar a quantidade de bactérias endofíticas que possuem resultados positivos das atividades enzimáticas. É possível ver 14 bactérias extraídas das folhas e ramos que possuem ação de celulase. 24 bactérias de folhas e 22 de ramos com ação para amilase, 1 de folha e ramo para lipase e 1 de folhas e ramos para esterase.

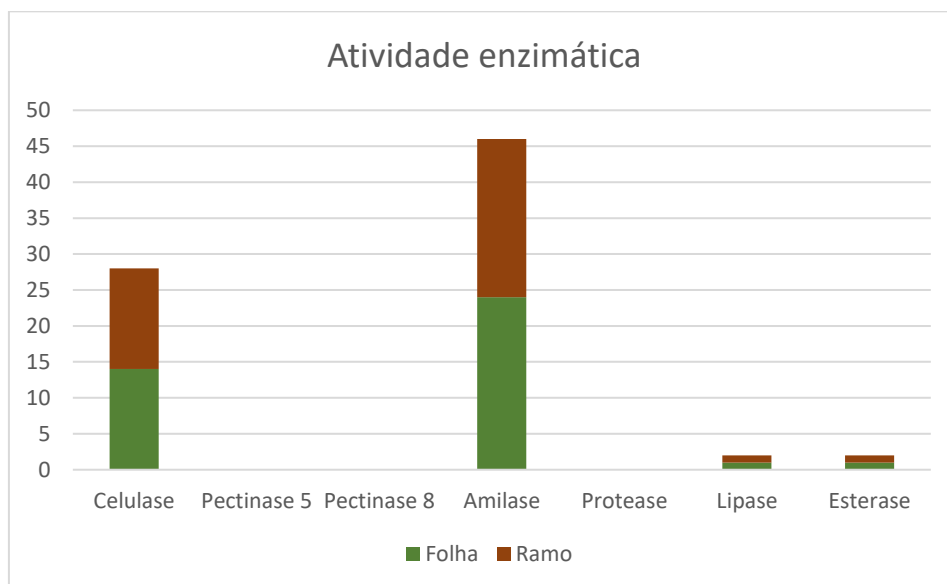


Figura 15: Atividade enzimática de bactérias endofíticas extraídas de folhas e ramos da planta *Anacardium humile*.

Segundo o trabalho de (Cardoso et al, 2020), que foram isoladas bactérias endofíticas, possuiu 71% de resultados positivos para amilase, 10% para lipase, 69% para esterase, 61% para protease e 15% para celulase. No trabalho de (Raj et al, 2025), foi isolado o *Bacillus subtilis*, avaliada suas atividades enzimáticas positiva para amilase, protease e celulase. Esses resultados de protease positivas também foram vistas no trabalho de (Orhan et al, 2005). Portanto, as características das enzimas apresentadas neste trabalho são compatíveis a trabalhos já existentes. Isso pode ser afirmado também pelos resultados de enzimas positivas de *Bacillus amyloliquefaciens*, visto no trabalho de (Ivanova et al, 1991) e (Deb et al, 2013).

5.3. Teste de atividade metabólicas antimicrobianas

Para as 65 bactérias endofíticas isoladas, foi feito o teste de halo de inibição, com seus extratos metabólicos, obteve-se como resultado 15 extratos não geraram resultados

inibitórios para nenhuma das cepas, 7 apresentaram inibição contra *E. coli*, 6 inibiram apenas *S. aureus* e 2 inibiram *C. albicans*. 10 obtiveram resultados inibitórios contra *E. coli* e *S. aureus*, 2 contra *E. coli* e *C. albicans* e 5 contra *S. aureus* e *C. albicans* simultaneamente. Apenas 4 endofíticos obtiveram resultados inibitórios contra os três microrganismos avaliados. Portanto, foram selecionados 2 endofíticos para os testes de crescimento bacteriano, uma vez que seus halos de inibição foram mais eficientes quando comparados aos restantes das bactérias endofíticas e assim, foi feito a curva de crescimento bacteriano. Foram selecionados os endofíticos de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*.

Na Figura 16, conseguimos observar alguns halos de inibição produzidas por diferentes bactérias endofíticas isoladas.

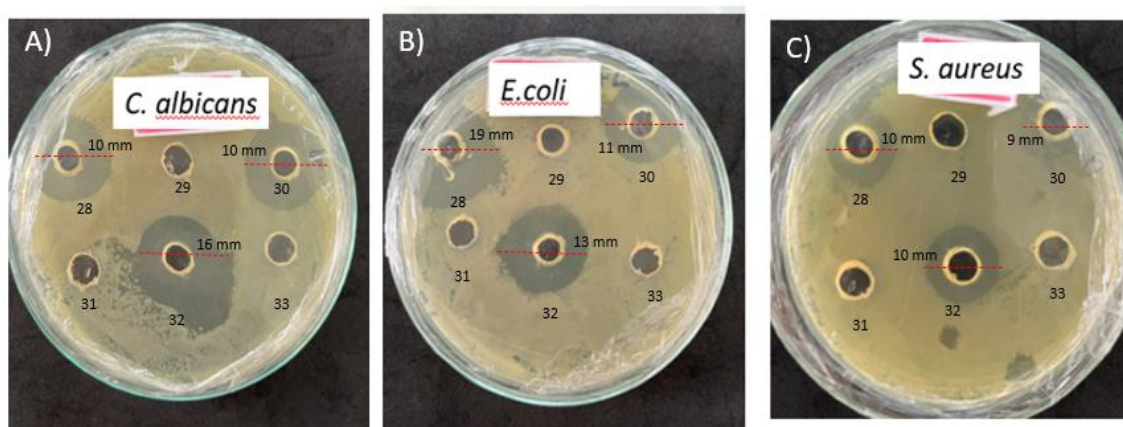


Figura 16: Halo de inibição dos diferentes extratos bacterianos endofíticos isoladas da planta *Anacardium humile* contra *C. albicans*, possuindo halos variados entre 10mm e 16mm (A). Contra *E. coli*, com halos variados entre 11mm a 19mm (B). Contra *S. aureus* com halos de 9mm (C).

Segundo trabalho de (Wang et al, 2024) e (Wisbeck et al, 2025), é visto atividade antibacteriana do *Bacillus subtilis* contra *E. coli* e *S. aureus*. Essa atividade, foi vista através do teste de difusão em disco, o qual possuiu uma média de halo de 15 mm para *E. coli* e 8 mm para *S. aureus*, os resultados, confirmam os halos possuídos, uma vez que deram similares. Já no trabalho de (Lin, Long-Zhen, et al, 2023), é visto halos de inibição contra *E. coli* de 15 mm e *S. aureus* de 14 mm.

5.4 Sequenciamento RNA ribossomal 16S

A Figura 17 mostra o gel de agarose após a eletroforese. Observa-se a presença de bandas nítidas e bem definidas nas amostras 1 com aproximadamente 1500 pb, 2 com aproximadamente 1500 pb sendo elas o *Bacillus subtilis* e 4 com aproximadamente 1400 pb, contendo o *Bacillus amyloliquefaciens*, indicando uma separação eficiente dos fragmentos de DNA. As bandas observadas foram comparadas com o marcador de peso molecular (*ladder*) e apresentam tamanhos compatíveis com os fragmentos esperados.

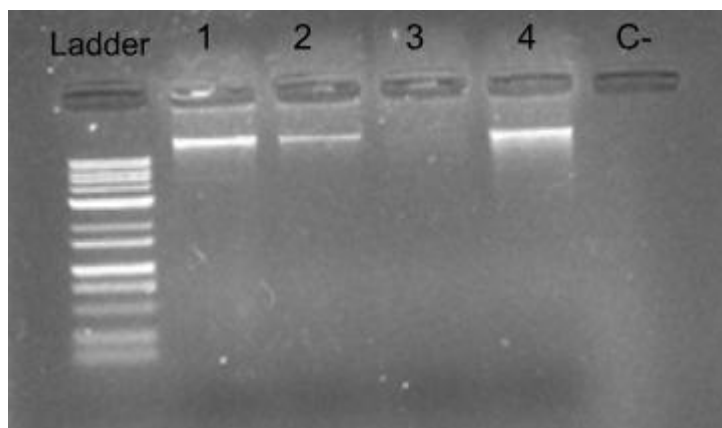


Figura 17: Amplificação do DNA dos endofíticos isolados. 1: Amostra *Bacillus amyloliquefaciens* 2: Amostra *Bacillus amyloliquefaciens* 3: Amostra *Bacillus subtilis* / 4: Amostra *Bacillus subtilis* / C-: controle negativo.

A partir do isolamento do DNA dos endofíticos escolhido, foi feito o sequenciamento das amostras com o método de sequenciamento de 16R, ambas as bactérias foram identificadas como gênero de *Bacillus*, porém com espécies diferentes, sendo elas *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*.

5.5 Curva de crescimento bacteriano

Foi avaliada a curva de crescimento, principalmente a fase exponencial e a fase estacionária, como mostrado na Figura 18, em que é notável a fase exponencial de ambas as bactérias ocorre entre 8 horas até 30 horas aproximadamente, e a fase estacionária também acontece em ambas a partir de 30 horas até 94 horas. Esses resultados ressaltam o momento em que há a produção de metabólitos secundários das bactérias, em que são liberadas no caldo em que a bactéria se encontra. Além disso, foi feita paralelamente os

halos de inibição com a fermentação obtida a cada 8 horas, esse estudo complementar permitiu avaliar as atividades inibitórias dos extratos em diferentes horários.

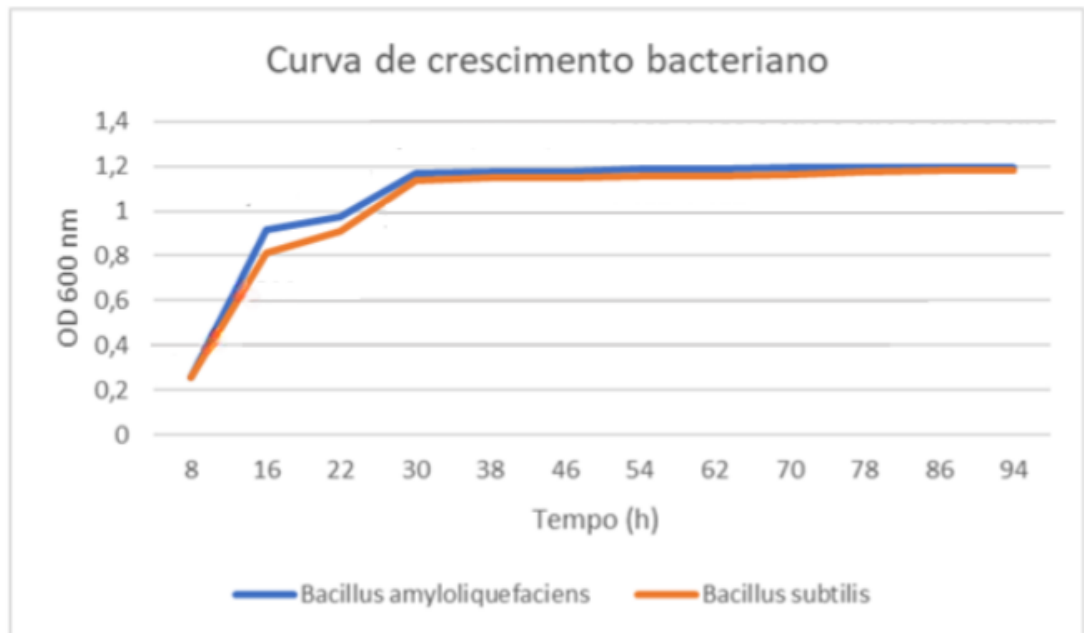


Figura 18: Cinética de crescimento das amostras *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* analisados pelo valor de absorbância em 600 nm versus tempo. A cada 8 horas foi medido a absorbância.

É importante avaliar a quantidade de unidades formadoras de colônia adjacente aos valores de absorbância da curva de crescimento, para a confirmação de presença de bactéria no meio em que ela está inserida, como mostra na Figura 19, que também compõe a curva de crescimento.

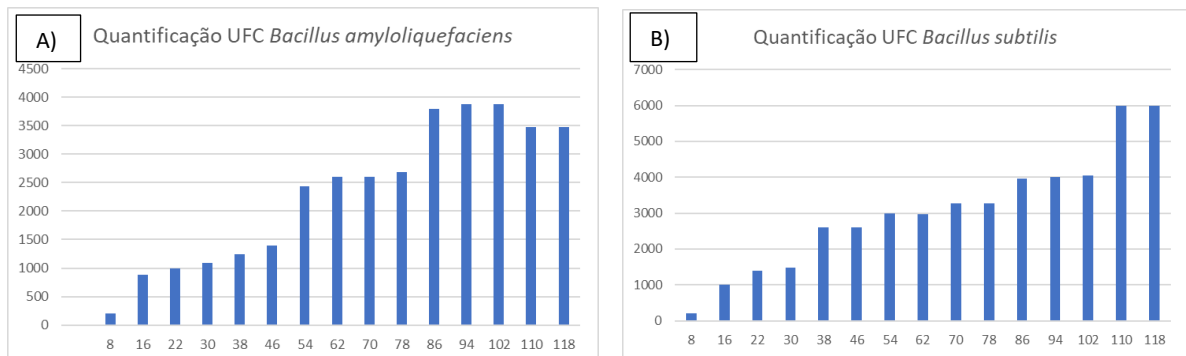


Figura 19: Quantificação de unidades formadoras de colônia *Bacillus amyloliquefaciens* (A) e *Bacillus subtilis* (B).

A curva de crescimento corrobora os trabalhos de (Liu, Gongwei, et al, 2025; Angulo, et al,2024; Yu, Rongrong et al, 2025), para o *Bacillus subtilis*, indicando a fase exponencial entre 4 e 8 horas e a fase log entre 14 a 24 horas.

5.6 Associação entre endofíticos e óleo essencial

Com base nas análises dos resultados obtidos do halo de inibição dos endofíticos em bactérias *E. coli*, *C. albicans* e *S. aureus*, verificou-se a necessidade de associar isolados endofíticos a óleos essenciais visando potencializar a atividade antimicrobiana do sistema. Deste modo, ao realizar o teste da concentração inibitória mínima, observou-se que, quando a composição de óleo essencial no meio endofítico é de até 12,5%, não há alteração nos compostos metabólicos. Assim, as porcentagens estudadas de óleos essenciais foram de 0,78%, 1,55%, 3,12%, 6,25% e 12,50%. Para isso, primeiramente foi feito o teste de halo de inibição com os extratos metabólicos produzidos em diferentes horas, de acordo com a curva de crescimento, a fase exponencial e estacionária, foi definido os tempos de 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas.

Na Tabela 2, é possível observar os tamanhos dos halos de *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* com os extratos metabólicos isolados de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, além da associação de ambos extratos. Também consegue-se observar o halo de inibição dos óleos essenciais isolados de limoneno ou *Óleo essencial de limoneno*, manjeriço ou *O. basilicum* e de cravo da Índia ou *Óleo essencial de manjeriço* e eles em associação. A partir dessa Figura, é visto que ambos extratos metabólicos são eficientes contra as três cepas avaliadas, com destaque para *C. albicans*. Já os óleos essenciais, também possuem inibição adequada, porém o óleo essencial de limoneno e o óleo essencial de cravo possuem destaque para inibição bacteriana e o óleo essencial de manjeriço destaque para a inibição leveduriforme.

Tabela 2: Medição de halo da atividade antimicrobiana de extratos metabólicos de bactérias endofíticas, óleos essenciais e associação dos mesmos com atividade antagonista contra cepas clínicas de *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* em tempos diferentes.

Extrato metabólico*	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>B. subtilis</i> (24h)	17.7 ±0.0	15.0 ±0.0	15.3 ±0.6
<i>B. subtilis</i> (48h)	17.7 ±0.6	15.3 ±0.6	15.7 ±1.2
<i>B. subtilis</i> (72h)	13.3 ±3.1	8.7 ±1.2	8.7 ±0.6
<i>B. subtilis</i> (96h)	9.3 ±0.6	6.7 ±1.5	5.7 ±0.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> (24h)	15.0 ±0.0	14.0 ±0.0	11.7 ±1.2
<i>B. amyloliquefaciens</i> (48h)	14.3 ±0.6	13.0 ±1.0	10.7 ±0.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> (72h)	9.7 ±0.6	9.3 ±0.6	7.7 ±0.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> (96h)	5.0 ±2.6	6.7 ±2.1	3.3 ±1.5
<i>B. subtilis</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> (24h)	19.0 ±0.0	18.0 ±0.0	15.7 ±1.2
<i>B. subtilis</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> (48h)	18.7 ±0.6	16.3 ±1.2	14.3 ±0.6
<i>B. subtilis</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> (72h)	14.7 ±0.6	12.7 ±1.5	11.7 ±1.2
<i>B. subtilis</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> (96h)	9.3 ±0.6	10.0 ±0.6	9.7 ±1.2
Óleo essencial de limoneno (OL)	9.3 ±0.6	20.3 ±0.6	21.0 ±1.0
Óleo essencial de manjeriço (OM)	9.7 ±0.6	17.3 ±0.6	17.0 ±1.7
Óleo essencial de Cravo (OC)	18.7 ±0.6	11.7 ±2.9	10.7 ±0.6

OL +OC (1:1)	9.3 ±0.6	20.3 ±0.6	18.3 ±1.5
OL+OM (1:1)	10.7 ±0.6	13.0 ±1.7	11.7 ±2.1
OC+OL (1:1)	13.0 ±2.0	11.0 ±1.0	12.0 ±1.7
OC+OL+OM (1:1:1)	18.0 ±1.0	14.7 ±0.6	13.7 ±0.6

* “OC” é o óleo essencial de cravo, “OL” representa o óleo essencial de limoneno e “OM” é o óleo essencial de manjeriço.

Esses resultados permitiram identificar que os halos mais significantes foram encontrados nas fermentações de 24 e 48 horas. Segundo estudos de Wang e colaboradores (2024), foi avaliado os melhores tempos de cultivo do *Bacillus subtilis*, em que esse tempo foi estabelecido em 48 horas. Lin e colaboradores (2020), analisa e compara o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus amyloliquefaciens* e definem que o *B. amyloliquefaciens* possuem um espectro de ação mais amplo quando comparados aos *B. subtilis*, inibindo ampla variedade de microrganismos, porém, nesse estudo avaliou a equidade entre os espectros de ação entre ambas bactérias. Essa análise definiu o tempo de fermentação das bactérias endofíticas em 48 horas e assim, os resultados obtidos da Tabela 2, foram importantes para a seleção dos experimentos subsequentes. Na Tabela 3, é possível observar a associação do extrato metabólico de *Bacillus subtilis* com os óleos essenciais que foram estudados. Avaliando os resultados, é possível observar que a associação do extrato metabólico de *Bacillus subtilis* com o óleo essencial de limoneno, possui uma atividade mais eficaz nas concentrações de 12,5% nas bactérias de *S. aureus* e levedura de *C. albicans* do que quando observado os valores dos halos isolados presentes na Tabela 2. Isso é notado também na associação desse extrato metabólico juntamente com óleo essencial de manjeriço, em que em 12,5% possui ação mais eficaz contra *C. albicans* e *S. aureus*. Na associação do extrato com óleo essencial de limoneno e óleo essencial de cravo, em 12,5%, contra leveduras também é perceptível.

A junção de óleo essencial de limoneno, óleo essencial de manjeriço e extrato de *B. subtilis*, possui ação superior do que quando comparado isoladamente em 12,5% nos três microrganismos e em 6,25% contra *E. coli*. Quando há associação dos três óleos

essenciais e o extrato, é notório em 12,5% o valor de halo superior em todos os microrganismos testados e em 6,25% em Gram positiva.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana de extrato metabólico de *Bacillus subtilis* fermentado em 48 horas associado com óleos essenciais antagonistas a *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*.

Extrato metabólico + óleo essencial*	Concentração [%]	Medição do halo (mm)		
		<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Bacillus subtilis</i> [87.5–99.219]				
OL	[12.5]	12.3 ±2.5	13.0 ±0.0	22.0 ±2.6
	[6.25]	10.7 ±1.2	13.3 ±1.2	18.3 ±0.6
	[3.125]	11.7 ±1.5	11.0 ±1.7	19.7 ±1.5
	[1.563]	9.3 ±0.6	11.3 ±2.9	15.0 ±0.0
	[0.781]	8.3 ±0.6	7.7 ±0.6	9.7 ±1.5
OM	[12.5]	8.7 ±0.6	5.0 ±0.0	15.0 ±0.0
	[6.25]	7.3 ±0.6	4.3 ±3.2	14.3 ±0.6
	[3.125]	6.7 ±0.6	5.0 ±1.0	10.7 ±0.6
	[1.563]	5.7 ±1.5	5.3 ±0.6	8.7 ±1.2
	[0.781]	1.7 ±2.9	0.7 ±1.2	5.0 ±0.0
OC	[12.5]	17.3 ±0.6	12.7 ±0.6	19.3 ±0.6
	[6.25]	13.7 ±0.6	12.3 ±0.6	14.0 ±1.7

	[3.125]	12.0 ±1.0	11.0 ±1.7	12.0 ±1.0
	[1.563]	10.3 ±0.6	11.3 ±1.2	10.7 ±0.6
	[0.781]	8.7 ±0.6	8.3 ±0.6	11.0 ±1.0
OL + OM (1:1)	[12.5]	9.7 ±0.6	11.7 ±1.2	17.3 ±0.6
	[6.25]	8.7 ±0.6	9.3 ±3.1	16.0 ±1.0
	[3.125]	8.3 ±1.2	12.3 ±2.1	15.0 ±1.0
	[1.563]	8.3 ±0.6	11.0 ±1.0	11.3 ±0.6
	[0.781]	7.3 ±0.6	3.7 ±2.3	9.0 ±0.0
OL+OC (1:1)	[12.5]	19.3 ±0.6	19.3 ±1.2	15.7 ±1.2
	[6.25]	14.7 ±1.2	16.7 ±1.5	13.3 ±1.2
	[3.125]	13.7 ±0.6	14.3 ±0.6	11.0 ±1.0
	[1.563]	10.7 ±1.2	12.3 ±2.5	9.0 ±1.0
	[0.781]	8.7 ±0.6	10.7 ±1.2	7.3 ±0.6
OC+OM (1:1)	[12.5]	16.7 ±2.1	10.7 ±1.2	14.3 ±0.6
	[6.25]	11.3 ±2.3	10.0 ±0.0	12.7 ±0.6
	[3.125]	8.7 ±0.6	10.7 ±0.6	10.0 ±0.0
	[1.563]	8.0 ±1.0	8.3 ±0.6	10.0 ±1.0
	[0.781]	8.0 ±0.0	8.7 ±0.6	7.7 ±0.6
OC+OL+OM (1:1:1)	[12.5]	18.0 ±1.0	20.0 ±0.0	16.3 ±1.2

[6.25]	15.0 ±1.0	14.3 ±0.6	13.7 ±0.6
[3.125]	12.7 ±0.6	12.0 ±2.6	10.7 ±1.2
[1.563]	11.7 ±1.5	10.0 ±1.7	7.0 ±0.0
[0.781]	9.3 ±0.6	7.3 ±1.2	7.3 ±0.6

* “OC” é o óleo essencial de cravo, “OL” representa o óleo essencial de limoneno e “OM” é o óleo essencial de manjeriço.

Na Tabela 4, observa-se a associação do extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* com os óleos essenciais que foram estudados. Avaliando os resultados, é possível observar que a associação do extrato metabólico de BA com o óleo de *Óleo essencial de limoneno*, possui uma atividade melhor nas concentrações de 12,5% contra as três cepas estudadas. Na concentração de 6,25% possui atividade melhor contra *C. albicans* e *S. aureus* quando comparados aos halos obtidos com os compostos isolados. Resultado semelhante também é verificado na associação do extrato metabólico com óleo essencial de cravo, que demonstra efeito mais pronunciado contra *S. aureus* nas concentrações de 12,5%, 6,25% e 3,12%.

A junção desse extrato metabólico com óleo essencial de limoneno e óleo essencial de cravo possui ação superior quando comparados isoladamente, nas três cepas em concentrações de 12,5%, 6,25% e 3,12%. Os valores superiores associados do que isolados, também é encontrado quando o extrato está ligado ao óleo essencial de manjeriço e Óleo essencial de cravo conjuntamente, com concentração de 12,5% contra *E. coli* e *S. aureus* e concentração de 6,25% contra *E. coli*. Já, quando há o conjunto dos três óleos essenciais com o extrato, se tem um destaque nas concentrações de 12,5% contra os três microrganismos avaliados, 6,25% contra levedura e Gram negativa e 3,12% contra *E. coli*.

Tabela 4: Atividade antimicrobiana de extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 48 horas associados com óleos essenciais antagonísticos a *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*.

Extrato metabólico + óleo essencial*	Concentração [%]	Medição de halo (mm)		
		<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	[87.5–99.219]			
OL	[12.5]	14.7 ±0.6	21.3 ±1.5	23.7 ±0.6
	[6.25]	14.7 ±0.6	19.3 ±1.2	21.0 ±2.0
	[3.125]	13.0 ±1.7	16.3 ±1.5	19.3 ±0.6
	[1.563]	10.0 ±0.0	12.3 ±0.6	15.0 ±0.0
	[0.781]	7.0 ±1.7	10.0 ±0.0	8.0 ±0.0
OM	[12.5]	9.0 ±0.0	13.3 ±1.2	10.7 ±0.6
	[6.25]	7.3 ±0.6	9.3 ±1.2	10.7 ±1.2
	[3.125]	7.3 ±0.6	7.3 ±0.6	8.0 ±0.0
	[1.563]	5.3 ±1.5	6.7 ±0.6	6.7 ±1.2
	[0.781]	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.0 ±0.0
OC	[12.5]	15.0 ±0.0	19.7 ±0.6	16.3 ±1.2
	[6.25]	15.0 ±0.0	13.3 ±0.6	15.0 ±0.0
	[3.125]	14.0 ±1.0	11.0 ±1.0	14.7 ±0.6

	[1.563]	11.3 ±0.6	8.0 ±0.0	8.7 ±0.6
	[0.781]	10.7 ±1.2	7.0 ±0.0	8.7 ±0.6
OL + OM (1:1)	[12.5]	10.0 ±0.0	15.3 ±0.6	15.3 ±0.6
	[6.25]	8.3 ±0.6	15.0 ±0.0	15.0 ±1.0
	[3.125]	7.7 ±0.6	14.0 ±2.0	8.0 ±0.0
	[1.563]	8.0 ±0.0	9.3 ±0.6	8.0 ±0.0
	[0.781]	5.0 ±0.0	8.3 ±0.6	8.0 ±0.0
OL+OC (1:1)	[12.5]	19.7 ±1.5	19.7 ±2.5	15.0 ±1.0
	[6.25]	20.0 ±0.0	19.7 ±2.1	13.0 ±1.7
	[3.125]	14.7 ±0.6	15.3 ±1.5	10.7 ±1.2
	[1.563]	12.3 ±2.1	10.3 ±1.2	10.0 ±0.0
	[0.781]	10.0 ±0.0	7.7 ±1.2	8.7 ±1.5
OC+OM (1:1)	[12.5]	10.0 ±0.0	18.3 ±1.5	13.0 ±2.6
	[6.25]	9.7 ±0.6	17.0 ±0.0	8.7 ±1.2
	[3.125]	9.0 ±1.0	12.0 ±2.6	7.3 ±0.6
	[1.563]	8.7 ±0.6	6.3 ±0.6	7.7 ±0.6
	[0.781]	3.3 ±2.9	7.0 ±0.0	4.0 ±0.0
OC+OL+OM (1:1:1)	[12.5]	21.7 ±1.2	23.0 ±1.0	16.7 ±1.5
	[6.25]	20.0 ±1.0	17.7 ±0.6	13.0 ±0.0

[3.125]	17.3 ±2.1	15.0 ±3.0	9.3 ±0.6
[1.563]	15.7 ±0.6	13.7 ±3.5	10.0 ±0.0
[0.781]	11.0 ±1.0	10.3 ±3.2	8.3 ±0.6

* “OC” é o óleo essencial de cravo, “OL” representa o óleo essencial de limoneno e “OM” é o óleo essencial de manjeriço.

Na Tabela 5, que apresenta os dados da junção dos extratos metabólicos, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, é perceptível que a associação com o *Óleo essencial de manjeriço*, possuem halo superior na concentração de 12,5% contra bactérias patogênicas estudadas. Quando esses extratos foram avaliados em combinação com *Óleo essencial de limoneno* e *Óleo essencial de manjeriço*, observou-se uma ação notável contra *E. coli* nas concentrações de 12,5%, 6,25% e 3,12%. Além disso, ao se analisar a associação dos três óleos essenciais em conjunto com esses extratos metabólicos, verificou-se que na concentração de 12,5% a inibição foi superior à obtida quando esses compostos foram testados isoladamente, tanto contra *C. albicans*, quanto contra *E. coli*.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana de extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. subtilis* fermentado em 48 horas associados com óleos essenciais antagônicos a *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*.

Extrato metabólico + óleo essencial	Concentração [%]	Medição de halo (mm)		
		<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>B. subtilis</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> (1:1) [87.5–99.219]				
OL	[12.5]	12.3 ±1.2	13.3 ±0.6	15.0 ±0.0
	[6.25]	10.7 ±1.2	14.0 ±1.0	14.7 ±0.6
	[3.125]	9.0 ±0.0	11.7 ±0.6	16.3 ±1.5
	[1.563]	8.7 ±0.6	12.3 ±1.2	12.3 ±0.6
	[0.781]	8.0 ±0.0	8.7 ±1.5	9.7 ±0.6
OM	[12.5]	10.3 ±0.6	9.0 ±0.0	13.3 ±1.2
	[6.25]	8.3 ±0.6	9.0 ±1.0	9.3 ±1.2
	[3.125]	7.7 ±0.6	8.3 ±1.5	7.3 ±0.6
	[1.563]	7.3 ±0.6	5.3 ±0.6	6.7 ±0.6
	[0.781]	6.3 ±0.6	0.7 ±1.2	0.0 ±0.0
OC	[12.5]	14.7 ±0.6	16.7 ±2.1	19.3 ±0.6
	[6.25]	11.0 ±1.7	9.3 ±0.6	12.0 ±1.7
	[3.125]	9.7 ±0.6	9.0 ±1.0	10.0 ±0.0

	[1.563]	10.7 ±0.6	9.0 ±1.0	8.7 ±0.6
	[0.781]	9.3 ±0.6	8.0 ±0.0	8.0 ±0.0
OL + OM (1:1)	[12.5]	12.0 ±0.0	12.0 ±1.0	11.7 ±1.2
	[6.25]	10.3 ±0.6	10.3 ±1.5	14.0 ±1.0
	[3.125]	9.7 ±0.6	12.3 ±2.1	11.3 ±0.6
	[1.563]	9.3 ±0.6	11.0 ±1.0	9.7 ±1.2
	[0.781]	8.7 ±0.6	6.7 ±1.5	8.3 ±0.6
OL+OC (1:1)	[12.5]	15.0 ±1.0	21.0 ±1.0	14.7 ±0.6
	[6.25]	13.7 ±0.6	16.7 ±2.1	9.7 ±0.6
	[3.125]	10.7 ±1.2	13.0 ±1.7	8.7 ±0.6
	[1.563]	8.7 ±0.6	9.7 ±0.6	8.3 ±0.6
	[0.781]	8.0 ±0.0	7.7 ±0.6	7.3 ±0.6
OC+OM (1:1)	[12.5]	16.0 ±1.0	14.0 ±1.7	10.7 ±1.2
	[6.25]	14.0 ±0.0	12.7 ±0.6	9.0 ±0.0
	[3.125]	11.0 ±1.7	9.3 ±0.6	8.0 ±1.0
	[1.563]	9.3 ±0.6	8.3 ±0.6	7.3 ±0.6
	[0.781]	8.3 ±0.6	6.7 ±1.2	5.7 ±0.6
OC+OL+OM (1:1:1)	[12.5]	19.3 ±0.6	15.7 ±1.5	14.7 ±0.6
	[6.25]	14.3 ±1.5	14.0 ±1.0	11.7 ±1.5

[3.125]	12.0 ±1.0	11.3 ±1.2	11.0 ±1.0
[1.563]	10.3 ±0.6	8.0 ±1.0	10.3 ±1.2
[0.781]	10.7 ±0.6	4.7 ±0.6	8.0 ±0.0

* “OC” é o óleo essencial de cravo, “OL” representa o óleo essencial de limoneno e “OM” é o óleo essencial de manjeriço.

Nos trabalhos de Santos, et al, 2025 e Li, Yanjie, et al, 2021 é estudado o potencial do óleo essencial de limoneno. Nesses trabalhos, foi feito o teste de atividade antimicrobiana contra *E. coli*, que possuiu um halo de 15 mm e de *S. aureus* com halo de inibição de 10 mm. (MACIEL, et al., 2022 e Martins, et al., 2020) que pesquisaram as ações do óleo essencial de manjeriço e conseqüentemente sua atividade inibitória, chegaram em uma média de 12 mm contra *E. coli* e 17 mm contra *S. aureus*. Os trabalhos de (Maheshika Sethunga et al, 2023 e Het T. et al, 2024) com foco no óleo essencial de cravo e suas ações antagonicas contra *C. albicans* com halo de 19 mm, *E. coli* com média de 14 mm e *S. aureus* com média de 13 mm.

Segundo os gráficos, é possível observar que a associação entre os óleos essenciais e os extratos metabólicos dos endofíticos, possuíram resultados mais eficientes quando associados ao óleo de cravo e ao óleo de limoneno. O óleo de manjeriço não possuiu um desempenho adequado e por essa razão, não foi dado continuidade aos experimentos relacionados ao manjeriço.

5.7 Análise estatísticas

Foram feitas análises estatísticas das amostras, utilizando o método de diagrama de *box plot*, objetivando identificar os melhores resultados para iniciar o processo de encapsulamento dos compostos com as nanofibras poliméricas produzidas por fiação por sopro em solução.

Conforme mostra a Figura 20, com relação a *C. albicans*, os melhores perfis de sensibilidade antimicrobiana são vistos nos extratos metabólicos de *Bacillus subtilis* em 24 e 48 horas, na associação de extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e *amyloliquefaciens*, também em 24 e 48 horas. Nos óleos essenciais, é visto essa ação no

óleo essencial de Óleo essencial de cravo e a associação entre o Óleo essencial de cravo, Óleo essencial de limoneno e Óleo essencial de manjeriço. É importante lembrar que todos esses valores são estatisticamente semelhantes.

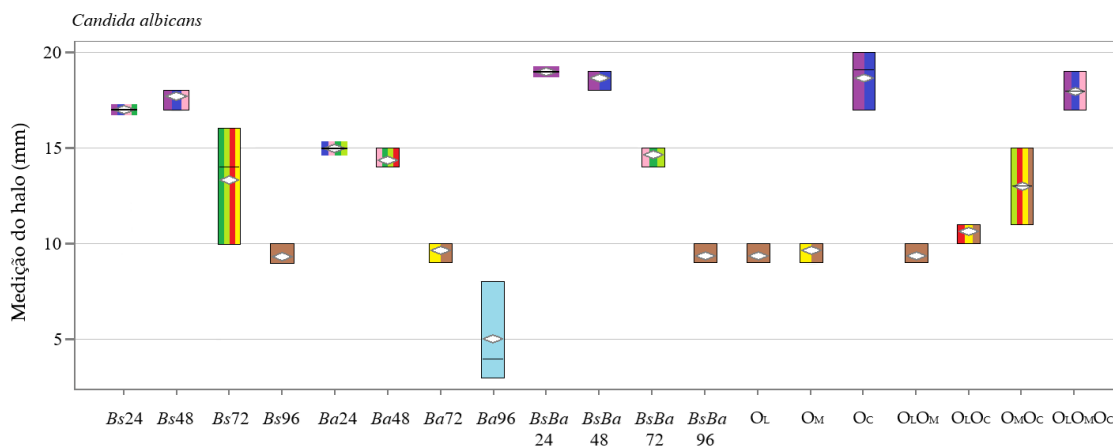


Figura 20: Análise estatística da medição do halo de inibição (mm) em função do extrato metabólico de *Bacillus subtilis* fermentado em 24 horas (*Bs24*), 48 horas (*Bs48*), 72 horas (*Bs72*) e 96 horas (*Bs96*), extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (*Ba24*), 48 horas (*Ba48*), 72 horas (*Ba72*) e 96 horas (*Ba96*), extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (*BsBa24*), 48 horas (*BsBa48*), 72 horas (*BsBa72*) e 96 horas (*BsBa96*), óleo essencial de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM), óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OLOM), óleo essencial de limoneno e cravo (OLOC), óleo essencial de manjeriço e cravo (OMOC) e óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OLOMOC), contra cepas de *C. albicans*.

Conforme mostra a Figura 21, com relação a *E. coli*, os melhores perfis de sensibilidade antimicrobiano é visto nos extratos metabólicos associados de extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e *amyloliquefaciens*, em 24 e 48 horas. Nos óleos essenciais, é visto essa ação no óleo essencial de Óleo essencial de limoneno, Óleo essencial de manjeriço e a associação entre o Óleo essencial de limoneno e Óleo essencial de manjeriço. É importante lembrar que todos esses valores são

estatisticamente

semelhantes.

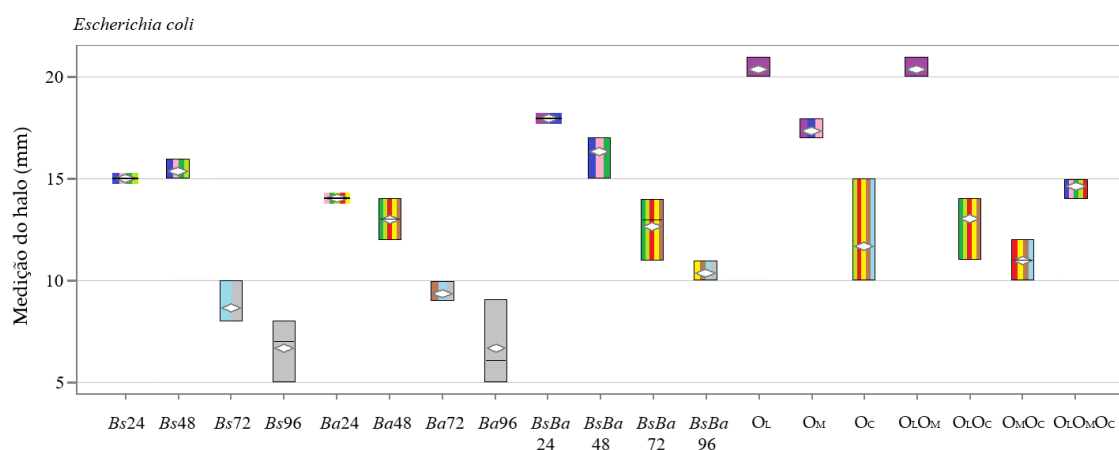


Figura 21: : Análise estatística da medição do halo de inibição (mm) em função do extrato metabólico de *Bacillus subtilis* fermentado em 24 horas (*Bs24*), 48 horas (*Bs48*), 72 horas (*Bs72*) e 96 horas (*Bs96*), extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (*Ba24*), 48 horas (*Ba48*), 72 horas (*Ba72*) e 96 horas (*Ba96*), extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (*BsBa24*), 48 horas (*BsBa48*), 72 horas (*BsBa72*) e 96 horas (*BsBa96*), óleo essencial de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriçao (OM), óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriçao (OLOM), óleo essencial de limoneno e cravo (OLOC), óleo essencial de manjeriçao e cravo (OMOC) e óleo essencial de limoneno, manjeriçao e cravo (OLOMOC), contra cepas de *E. coli*.

Conforme mostra a Figura 22, com relação a *S. aureus*, os melhores perfis de sensibilidade antimicrobiana são observados para os extratos metabólicos associados à *Bacillus subtilis* em 24 e 48 horas e extrato metabólico de *B. subtilis* associado a *amyloliquefaciens*, em 24 e 48 horas. Nos óleos essenciais, é visto essa ação no óleo essencial de Óleo essencial de limoneno e a associação entre o Óleo essencial de limoneno e Óleo essencial de manjeriçao. É importante lembrar que todos esses valores são estatisticamente semelhantes.

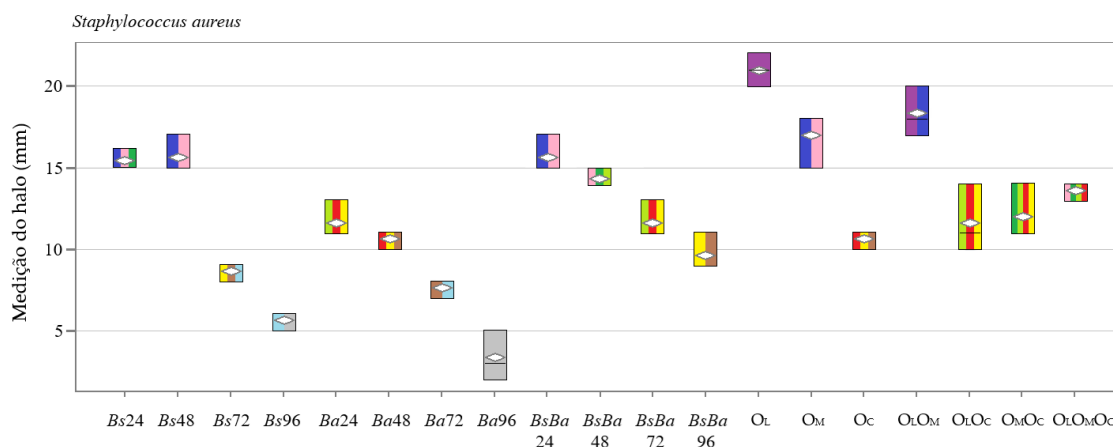


Figura 22: Análise estatística da medição do halo de inibição (mm) em função do extrato metabólico de *Bacillus subtilis* fermentado em 24 horas (*Bs24*), 48 horas (*Bs48*), 72 horas (*Bs72*) e 96 horas (*Bs96*), extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (*Ba24*), 48 horas (*Ba48*), 72 horas (*Ba72*) e 96 horas (*Ba96*), extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* fermentado em 24 horas (*BsBa24*), 48 horas (*BsBa48*), 72 horas (*BsBa72*) e 96 horas (*BsBa96*), óleo essencial de limoneno (OL), óleo essencial de manjeriço (OM), óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjeriço (OLOM), óleo essencial de limoneno e cravo (OLOC), óleo essencial de manjeriço e cravo (OMOC) e óleo essencial de limoneno, manjeriço e cravo (OLOMOC), contra cepas de *S. aureus*.

Analisando as Figuras 20, 21 e 22 pode-se dizer que os extratos metabólicos se comportam de maneira distinta para os diferentes microrganismos estudados. Porém, é possível observar que em todos os casos, conforme o extrato metabólico vai fermentando, há um declínio na presença dos bioativos nos mesmos. E os óleos essenciais se comportam de maneira semelhantes em bactérias, porém, a levedura possui um comportamento distinto. Em todos os casos, quando analisados estatisticamente, os melhores resultados estão correlacionados a 48 horas de fermentação dos extratos metabólicos, portanto, será estudado apenas os resultados.

Na Figura 23, é possível observar os melhores tratamentos quando os óleos essenciais estão correlacionados a extrato metabólico de *Bacillus subtilis*. Em a) é mostrado o resultado contra *C. albicans*, sendo que os resultados que mais se destacaram foram, os óleos de Óleo essencial de manjeriço, a associação de Óleo essencial de limoneno e Óleo essencial de manjeriço e quando há a correlação dos três óleos

essenciais com o extrato de *B. subtilis*. Além disso, é possível observar que esses três valores são estatisticamente semelhantes. Para resultados contra cepa de *E. coli*, o melhor resultado foi a associação do *Bacillus subtilis* com o Óleo essencial de limoneno e Óleo essencial de manjeriçã. Ainda, é possível observar que não há resultados estatisticamente diferentes um dos outros. Na imagem c) há um decaimento dos resultados quando os óleos essenciais estão correlacionados com óleos essenciais de manjeriçã.

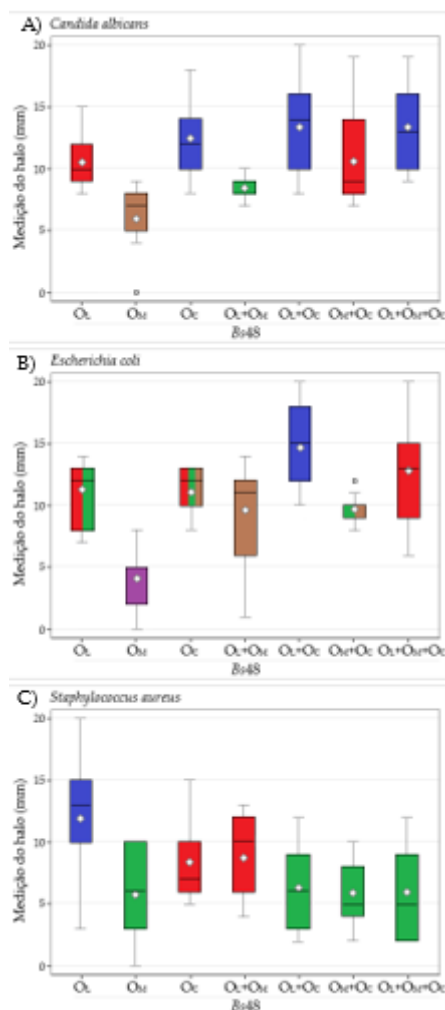


Figura 23: Perfis de atividade antimicrobiana por mediçãõ de halo de inibiçãõ em funçãõ do extrato metabólicõ de *B. subtilis* fermentado em 48 horas (*Bs48*) associado a óleos essenciaes de limoneno (OL) , óleo essenciae de manjeriçãõ (OM), óleo essenciae de cravo (OC), óleo essenciae de limoneno e manjeriçãõ (OL+OM), óleo essenciae de limoneno e cravo (OL+OC), óleo essenciae de manjeriçãõ e cravo (OM+OC), óleo essenciae de limoneno, manjeriçãõ e cravo (OL+OM+OC) contra *C. albicans* A) Perfis de atividade antimicrobiana por mediçãõ de halo de inibiçãõ em funçãõ do extrato

metabólico de *B. subtilis* fermentado em 48 horas (*Bs48*) associado a óleos essenciais de limoneno (OL) , óleo essencial de manjerição (OM) em concentração de 1:1, óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjerição (OL+OM), óleo essencial de limoneno e cravo (OL+OC), óleo essencial de manjerição e cravo (OM+OC), óleo essencial de limoneno, manjerição e cravo (OL+OM+OC) contra *E. coli* B) Perfis de atividade antimicrobiana por medição de halo de inibição em função do extrato metabólico de *B. subtilis* fermentado em 48 horas (*Bs48*) associado a óleos essenciais de limoneno (OL) , óleo essencial de manjerição (OM) em concentração de 1:1, óleo essencial de cravo (OC), óleo essencial de limoneno e manjerição (OL+OM), óleo essencial de limoneno e cravo (OL+OC), óleo essencial de manjerição e cravo (OM+OC), óleo essencial de limoneno, manjerição e cravo (OL+OM+OC) contra *S. aureus* C) sendo que médias com a mesma coloração não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1).

Na Figura 24, analisando as diferentes concentrações, é perceptível que o melhor resultado prevalece sendo com a maior concentração dos óleos essenciais contra as três cepas estudadas de *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. Portanto, os melhores tratamentos se dão com a concentração de 12,5% de óleos essenciais.

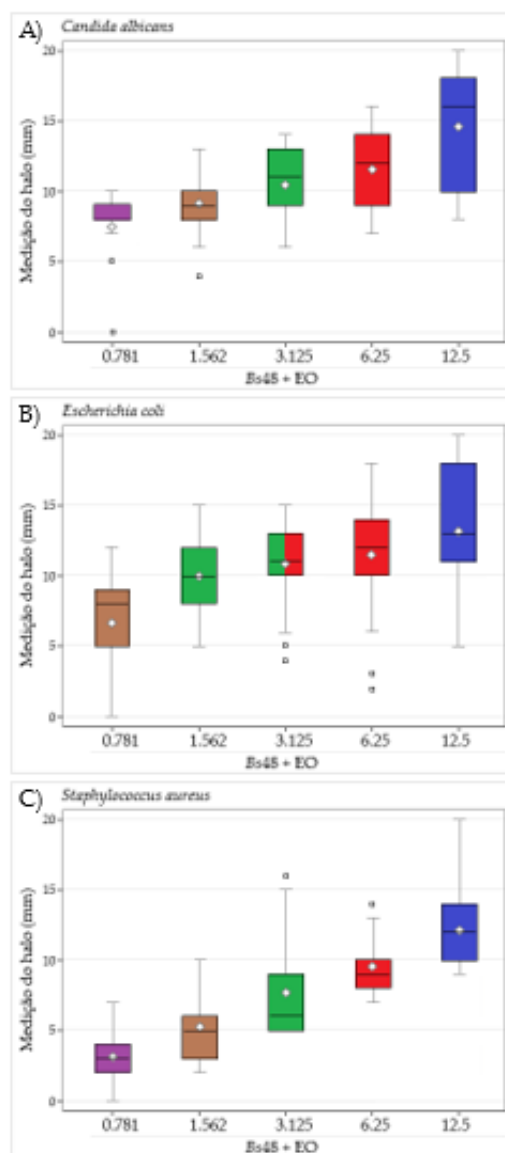


Figura 24: Perfis de atividade antimicrobiana de medição de halo (mm) por concentrações de óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo associado extrato metabólico de *B. subtilis* (*Bs48+EO*) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1), contra *C. albicans* (A). Perfis de atividade antimicrobiana de medição de halo (mm) por concentrações de óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo associado extrato metabólico de *B. subtilis* (*Bs48+EO*) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1), contra *E. coli* (B). Perfis de atividade antimicrobiana de medição de halo (mm) por concentrações de óleos essenciais de manjeriço, limoneno e cravo associado extrato metabólico de *B. subtilis* (*Bs48+EO*) em diferentes concentrações (0,781-12,5%) e combinações (1:1 e 1:1:1), contra *S. aureus* (C). sendo que médias com a mesma coloração não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

5.8 Produção de fibras poliméricas contendo ativos

A partir dos resultados e análise estatística, foram selecionados os extratos metabólicos bacterianos em 48 horas de fermentação, associados aos óleos essenciais de limoneno, cravo e limoneno + cravo para dar continuidade aos testes. Foram feitas amostras contendo 10% e 15% de princípio ativo, sendo uma mistura de 12,5% de óleo essencial e 87,5% de extrato metabólico de *Bacillus*, fermentado a 48 horas para a produção das nanofibras. A Figura 25, apresenta as imagens digitais (fotografias) das mantas de fibras fabricadas pela técnica de SBS, utilizando com polímero Ecovio incorporada aos extratos metabólicos e óleos essenciais. Nessa Figura, é possível observar que as mantas incorporadas a óleo essenciais de cravo, sintetiza mantas homogêneas enquanto as mantas com óleo essencial de limoneno, apresentam características como rigidez e são mais quebradiças. Portanto, o óleo essencial de cravo, demonstra ser mais eficiente do que as outras associações.

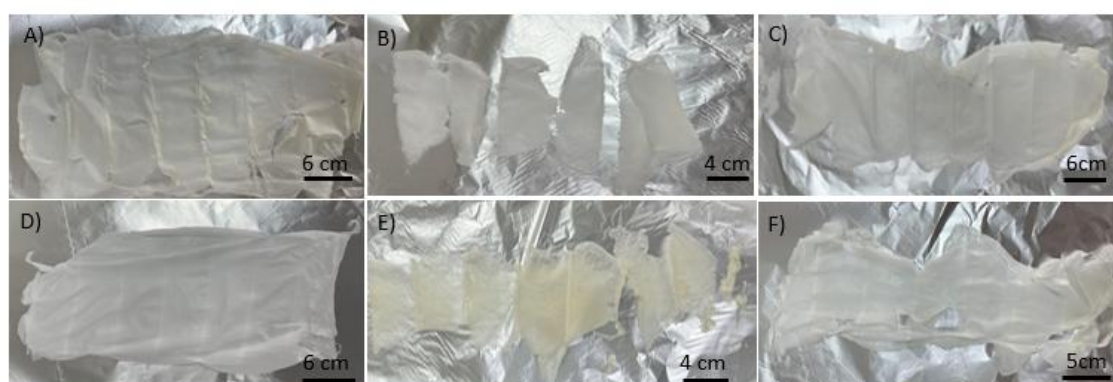


Figura 25: Imagens das mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo (A). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de limoneno (B). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo e limoneno (C). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo (D). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de limoneno (E). Mantas poliméricas contendo extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo e limoneno (F).

A morfologia das amostras foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostrado na Figura 26 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** As micrografias obtidas indicam que as fibras possuem uma orientação aleatória e superfície lisa, com diferentes diâmetros. A Figura 26 demonstra que as mantas constituídas com óleo essencial de cravo, possuem maior uniformidade no diâmetro das fibras, enquanto as que são incorporadas com óleo essencial de limoneno possuem diâmetros extremamente distintos. Isso comprova que a incorporação do óleo de cravo interagiu positivamente com as mantas.

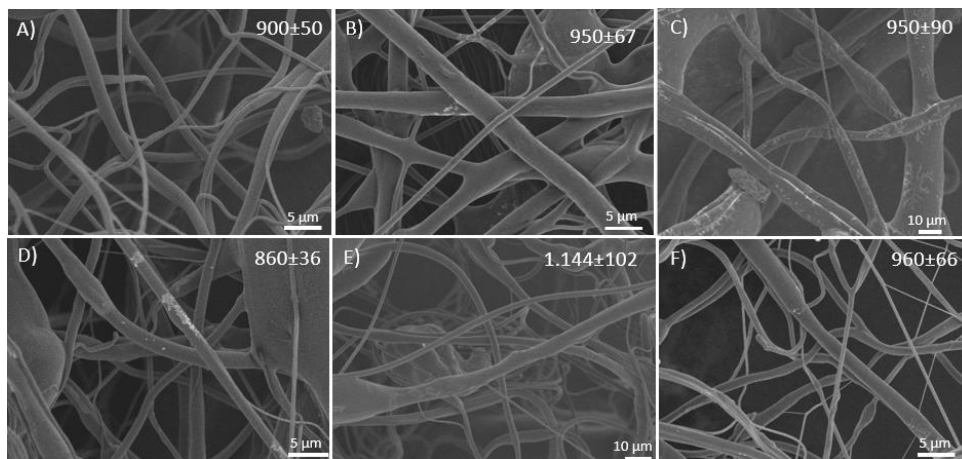


Figura 26: Óleo essencial de cravo e extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* (A). Óleo essencial de limoneno e extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* (B). Óleo essencial de cravo e limoneno e extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* (C). Óleo essencial de cravo e extrato metabólico de *Bacillus subtilis* (D). Óleo essencial de limoneno e extrato metabólico de *Bacillus subtilis* (E). Óleo essencial de cravo e limoneno e extrato metabólico de *Bacillus subtilis* (F).

As nanofibras produzidas a partir dos diferentes princípios ativos e concentrações, foram investigadas a partir da técnica de FTIR, e os resultados estão apresentados na Figura 26.

O polímero Ecovio, é uma blenda polimérica, a qual possui em sua composição o polímero PLA e PBAT. Sendo assim, o espectro deste polímero é formado pela sobreposição de bandas espectrais referentes a ligações químicas como C-C, C-H, C-O, C=O, C-O-C, que compõem funções orgânicas como ésteres, ácidos carboxílicos e anéis

aromáticos, entre outras. Bandas referentes às ligações C-C da cadeia carbônica e C-H fora do plano de anéis aromáticos apresentam-se em regiões de baixa frequência (inferiores a 800 cm^{-1}). As ligações C-H são indicadas pela presença da banda vista na região 2947 cm^{-1} (Gusmão et al, 2020). Na região de 1711 cm^{-1} , é encontrada a banda das ligações éster e carbonilas C=O, em 1182 cm^{-1} , confirma a presença do C-O e C-O-C (De Souza et al, 2024; Gusmão et al, 2020). A banda de 1450 cm^{-1} , é decorrente do estiramento angular assimétrico de grupo CH_3 (De Souza et al, 2024; Gusmão et al, 2020). Ligações C-H de anéis aromáticos são identificadas por bandas na região $300\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ (Gusmão et al, 2020). Assim, é possível confirmar que as mantas são compostas de polímeros ecovio

Como é sabido, a principal molécula vista no óleo essencial de cravo é o eugenol (Waghmare, 2015), essa molécula consta com um anel aromático substituído com grupamentos éter, hidroxila e alila. Na técnica de FTIR, foi analisado o óleo essencial de cravo, com a finalidade de confirmar a presença ou a ausência dos óleos essenciais nas fibras de ecovio. Para tanto, foi possível observar, para o óleo essencial de cravo, bandas características de C H de anéis aromáticos em $3100 - 2990\text{ cm}^{-1}$ (Hadidi et al, 2020). Bandas na região de $1450 - 1600\text{ cm}^{-1}$, referem-se aos estiramentos das ligações carbono-carbono do anel. As bandas em 1639 , confirmam a presença de alceno C=C (Waghmare, 2015; Nisar et al, 2018; Unalan, et al, 2019), e em 1510 e 3100 de hidrocarbonetos aromáticos (Hadidi et al, 2020). Já a banda 3460 confirmam a presença dos fenóis (anel aromático ligado ao OH) (Waghmare, 2015; Nisar et al, 2018). Esses componentes são essenciais no óleo essencial de cravo.

O espectro das amostras de mantas contendo óleos essenciais como é visto na Figura a) em BA+OC15% e BA+OC10%, na Figura c) BA+OC+OL 15%, BA+OC+OL 10% na Figura d) BS+OC15%, BS+OC10% e na Figura f) BS+OC+OL 15% e BS+OC+OL10% é possível confirmar a presença do óleo essencial pela curva vista em 2947 (Tarhan et al,2022), que está relacionada não só ao grupo C-H no óleo essencial como também no extrato metabólico do *Bacillus*. Devido aos hidrocarbonetos do óleo essencial de cravo encontrado em 1510 , é visto nas mantas, a presença da banda 1510 , reafirmando a presença do óleo essencial nas mantas. A banda 3460 cm^{-1} também evidencia a presença de óleo essencial nas mantas de Ecovio.

O óleo essencial de limoneno, possui em sua composição átomos de carbono e hidrogênio, contendo ligações simples e duplas e um ciclo-hexano. Na análise de FTIR, o óleo essencial de limoneno consta com a banda em 2918 é visto o grupamento C-H simétrico em 2855 e 2833 com a ligação C-H assimétrico (Saucedo-Zuñiga et al. 2021; Padhan; Pattnaik; Behera, 2017). Também é visto na banda 1641 a ligação C=C (Nahas et al, 2025), na banda 1441 = CH₂ e em 883 =C-H (Padhan; Pattnaik; Behera, 2017; Nahas et al, 2025).

Nas mantas contendo óleo essencial de limoneno, observado na Figura 27 b)BA+OL15% e BA+OL10%, c) BA+OC+OL15% e BA+OC+OL10% e)S+OC BS+OL15% e BS+OL10% e f) BS+OC+OL15% e BS+OC+OL10% é possível confirmar a presença do óleo essencial de limoneno, pela presença da banda 1441 com a presença do =CH₂, além de possuir a presença da banda 883, com a ligação =C-H e o alongamento C-O em 795.

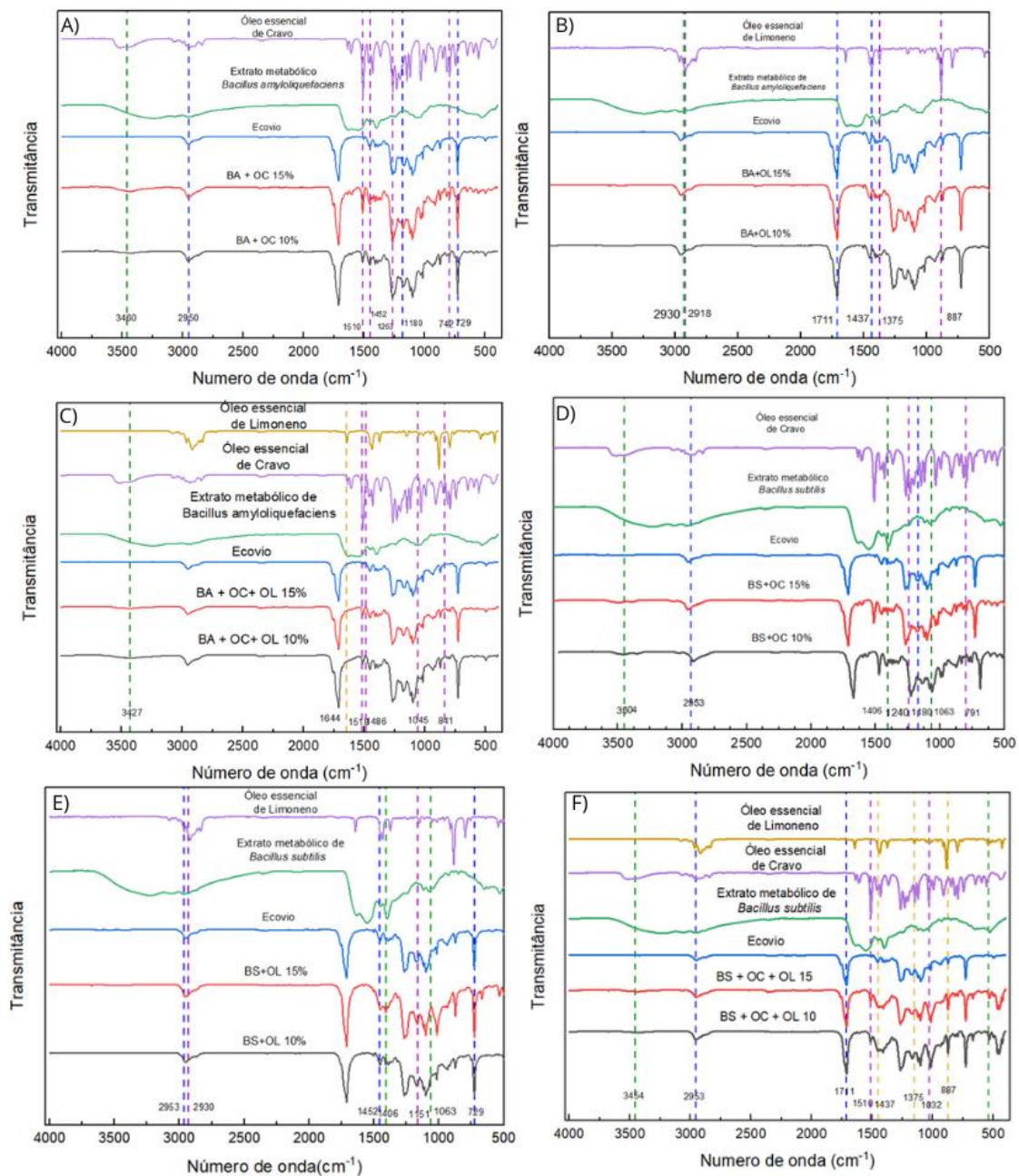


Figura 27: Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo, extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens*, polímero Ecovio, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo (OC) à 15% e *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo (OC) à 10% (A). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de limoneno, extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens*, polímero Ecovio, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de limoneno (OL) à 15% e *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de limoneno (OL) à 10% (B). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo e limoneno, extrato metabólico de *Bacillus*

amyloliquefaciens, polímero Ecovio, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo e limoneno (OC + OL) à 15% e *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) associado a óleo de cravo e limoneno (OC + OL) à 10% (C). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo, extrato metabólico de *Bacillus subtilis*, polímero Ecovio, *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo (OC) à 15% e *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo (OC) à 10% (D). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de limoneno, extrato metabólico de *Bacillus subtilis*, polímero Ecovio, *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de limoneno (OL) à 15% e *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de limoneno (OL) à 10% (E). Espectro de FTIR para nanofibras de óleo essencial de cravo e limoneno, extrato metabólico de *Bacillus subtilis*, polímero Ecovio, *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo e limoneno (OC + OL) à 15% e *Bacillus subtilis* (BS) associado a óleo de cravo e limoneno (OC +OL) à 10% (F).

Ao analisar o FTIR das fibras com ativos e sem ativos, não se observa a formação de novas bandas nem deslocamento significativos, sendo assim, não houve interação química entre os óleos essenciais e os extratos metabólicos com as mantas poliméricas.

Medidas de ângulo de contato da amostra foram realizadas, uma vez que a hidrofiliabilidade altera o potencial de aplicação em curativos para feridas (Ambekar, et al., 2019). A hidrofiliabilidade está relacionada à alta molhabilidade, que é particularmente eficaz nas feridas. As amostras contendo óleo de cravo possuíram alta hidrofiliabilidade, com valores do ângulo de $29,55 \pm 0,87$ como visto na Figura 28 (Ambekar, et al., 2019).

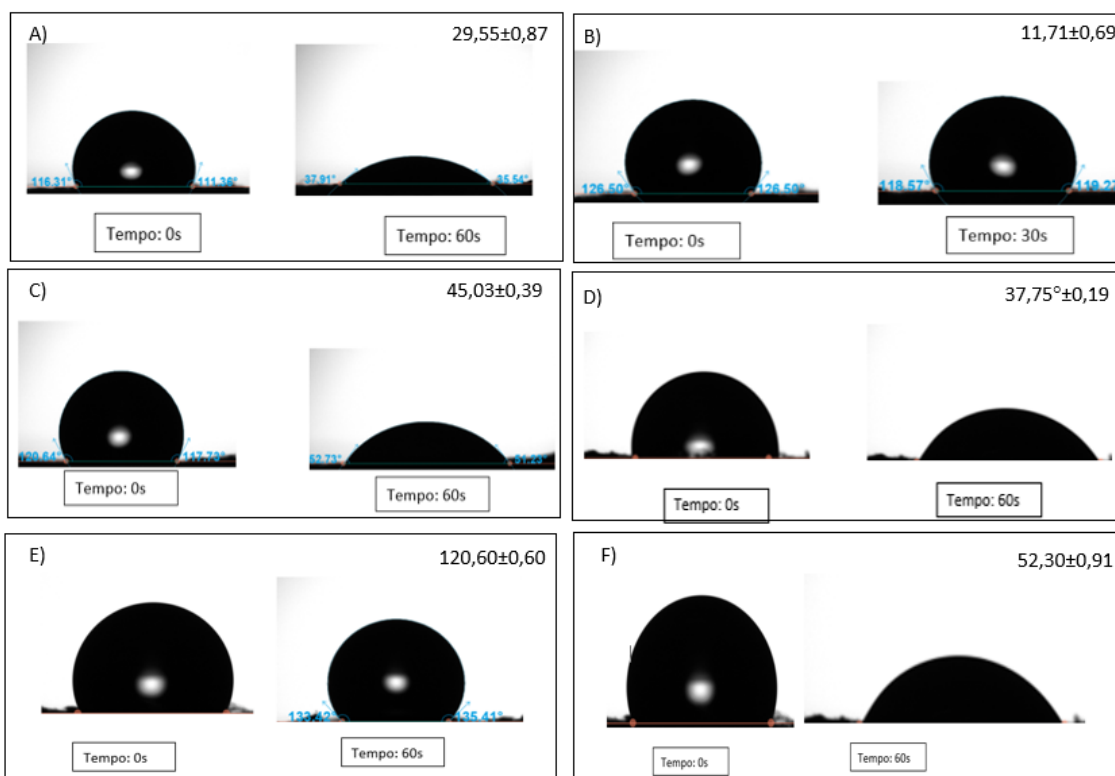


Figura 28: Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *B. amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo em 0 segundo e 60 segundos. (A). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *B. amyloliquefaciens* e óleo essencial de limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (B). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *B. amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo e limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (C). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo em 0 segundo e 60 segundos. (D). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (E). Ângulo de contato da manta nanofiada composta por extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo e limoneno em 0 segundo e 60 segundos. (F).

No ensaio de ângulo de contato, as fibras apresentam alteração na molhabilidade dependendo do composto incorporado a manta polimérica. Parin e colaboradores (2020), observam em seus estudos que o ângulo de contato hidrofílico é ideal para a aplicação de tratamento em feridas uma vez que quanto maior a hidrofiliabilidade, melhor aplicação na pele, facilitando a espalhabilidade e absorção. O ângulo de contato do óleo essencial de

cravo é hidrofílico devido a presença do grupo hidroxila em sua composição (Ahmad et al, 2023).

As mantas de nanofibras foram submetidas a ensaios de halo de inibição, com o objetivo de caracterizar o material e verificar se o diâmetro dos halos se mantinha em relação aos extratos testados isoladamente, sem a incorporação às nanofibras.

O halo de inibição foi avaliado com amostras de *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, conforme apresentado na tabela 6. A partir dos resultados obtidos, observa-se que nas muitas mantas houve uma redução do efeito inibitório após a incorporação das mantas. No entanto, destacam-se amostras cujo halos apresentam valores semelhantes aos observados antes da incorporação, indicando conservação da atividade antimicrobiana.

Tabela 6: Média de halo de inibição de mantas fiadas com Ecovio e extrato metabólico de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e óleo essencial de cravo e óleo essencial de limoneno.

Manta polimérica nanofiada	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Cravo 10%	17.0±0,51	15±0,97	12±0,51
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Cravo 15%	16.6±0,2	16,67±0,10	15±0,88
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Limoneno 10%	6 ±0.7	8 ±0.9	20±0.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Limoneno 15%	6 ±0.6	9 ±0.6	20.5±0.9
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de cravo e limoneno 10%	10.7 ±0.8	7.67 ±0.9	17.5 ±1,5
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de cravo e limoneno 15%	15 ±0.8	7.67 ±1,5	18 ±0.4
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo 10%	11.4±0.0	15±0.97	7.6±0.9

<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo 15%	10.5±0.7	20±0.8	9.5±10
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de limoneno 10%	8.5±0.9	7.7 ±0.8	20±0.9
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de limoneno 15%	9.0±0.5	8.9 ±0.0	20±1.5
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo + limoneno 10%	9.2±0.0	7.5±1.2	8.9±0.9
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo + limoneno 15%	10.6±0.8	10±0.0	9.2±1.5

O extrato apresentou um halo de inibição significativamente maior quando avaliado isoladamente, em comparação à sua forma incorporada às mantas de fibras. Por outro lado, a incorporação do extrato nas mantas resultou em menor citotoxicidade, o que representa uma vantagem importante para aplicações biomédicas. Ademais, o formato em mantas fibrosas possibilita seu uso potencial como curativo cutâneo, viabilizando estudos voltados à liberação controlada de compostos bioativos (Mercante; Corrêa, 2023).

Na Figura 29, é possível visualizar o halo de inibição das mantas poliméricas contra *C. albicans* em 10% e 15%.

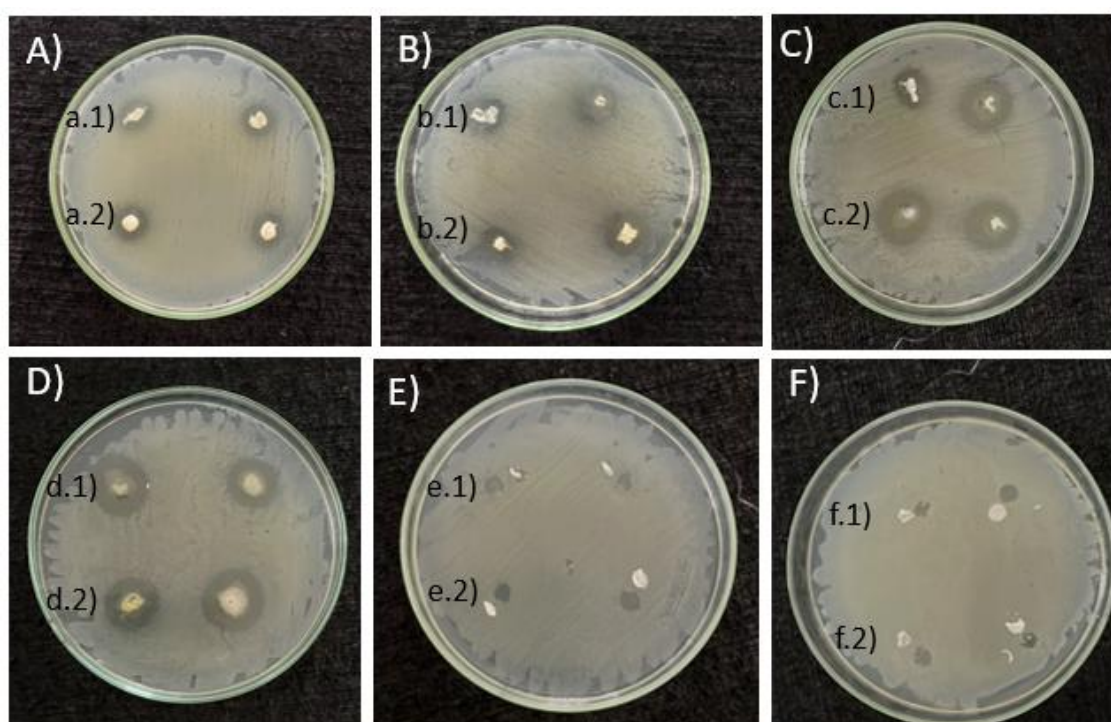


Figura 29: Halo de inibição mantas fiadas com polímero de Ecovio associado a extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo em a.1) 10% e a.2) 15% (A). Halo de inibição mantas fiadas com polímero de Ecovio associado a extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de limoneno em b.1) 10% e b.2) 15% (B). Halo de inibição mantas fiadas com polímero de Ecovio associado a extrato metabólico de *Bacillus amyloliquefaciens* e óleo essencial de cravo e limoneno em c.1) 10% e c.2) 15% (C). Halo de inibição mantas fiadas com polímero de Ecovio associado a extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo em d.1) 10% e d.2) 15% (D). Halo de inibição mantas fiadas com polímero de Ecovio associado a extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de limoneno em e.1) 10% e e.2) 15% (E). Halo de inibição mantas fiadas com polímero de Ecovio associado a extrato metabólico de *Bacillus subtilis* e óleo essencial de cravo e limoneno em f.1) 10% e f.2) 15% (F).

As mantas constituídas com óleo essencial de cravo, como apresentaram melhores incorporações as mantas do que os demais óleos essenciais, possuíram melhor liberação do composto e assim, maiores halos de inibição. Com isso, deduz-se que os materiais contendo óleo essencial de cravo, são mais compatíveis para a composição de curativos para tratamento de feridas.

O teste de diluição seriada foi realizado com o objetivo de determinar a porcentagem de mortalidade bacteriana. Para tanto, calculou-se a média dos valores obtidos, a fim de definir a porcentagem de inibição das amostras. Os resultados apresentados na tabela 7 as mantas com óleo essencial de cravo associados a *B. amyloliquefaciens* evidenciam destaque contra *S. aureus*, com valores superiores a 75%. Já as mantas com óleo essencial de limoneno associados a *B. amyloliquefaciens* evidenciam destaque contra *C. albicans*, com valores superiores a 75%.

Nas mantas incorporadas com *B. subtilis* e óleo essencial de limoneno, obtiveram resultados significativos nas 3 cepas estudadas. Já as amostras contendo *B. subtilis* associado a óleo essencial de cravo e limoneno obtiveram resultados superiores a 80% em cepas de *C. albicans*.

Manta polimérica nanofiada

C. albicans

E. coli

S. aureus

<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Cravo 10%	55%	73,33%	80%
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Cravo 15%	62%	81,67%	80,1%
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Limoneno 10%	80%	52%	54,6%
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de Limoneno 15%	82,5%	53,5%	55%
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de cravo e limoneno 10%	70,5%	59,5%	73,88%
<i>B. amyloliquefaciens</i> + Óleo essencial de cravo e limoneno 15%	75,5%	59,5%	83,52%
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo 10%	77,1%	70,7%	50,5%
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo 15%	80,9%	72,5%	50,5%
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de limoneno 10%	80,5%	87,2%	80,1%
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de limoneno 15%	85,7%	88,4%	80,5%
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo + limoneno 10%	80,9%	77,1%	78,1%
<i>B. subtilis</i> + Óleo essencial de cravo + limoneno 15%	93,1%	85,5%	80,1%

5.9 Teste de citotoxicidade

Conforme mostra a Figura 30, o metabolismo celular em % das células de fibroblastos encontradas na pele humana, apresentou uma redução significativa quando as células foram expostas por 24 horas a todos os co-cultivos, incluindo *B.*

amyloliquefaciens e subtilis e suas diluições. Esses resultados sugerem fortemente uma citotoxicidade associada a esses tratamentos, evidenciando que a presença dos co-cultivos compromete a capacidade das células de manter o funcionamento metabólico ideal. A produção de óxido nítrico (NO) ocorreu em alguns co-cultivos, o que sugere que as células estão sob estresse oxidativo (SALTZMAN, 1954). A diminuição no metabolismo celular e aumento da síntese de NO indicam que os compostos ou fatores presentes nesses co-cultivos podem interferir nas funções mitocondriais, resultando em um estado celular alterado e possivelmente induzindo mecanismos de estresse celular ou apoptose (GREEN et al., 1982). Já com as membranas a redução ocorreu somente com M BA+OL e M BS+OL. Não houve aumento de produção de NO em nenhuma análise.

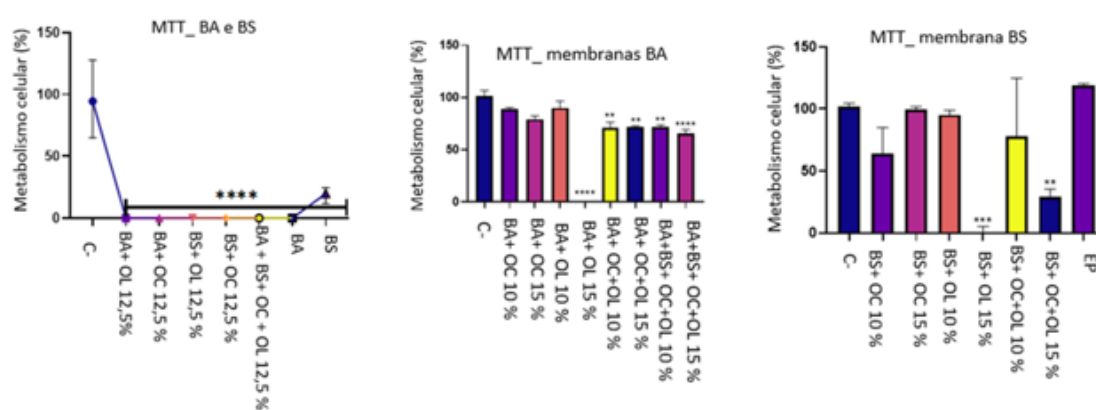


Figura 30: Ensaio de citotoxicidade em fibroblastos. Células HDFn após 24 horas de exposição aos extratos e membranas. C-: células vivas. (*) vs C-; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Os extratos metabólicos endofíticos associados aos óleos essenciais, apresenta citotoxicidade elevada aos fibroblastos. Porém, é perceptível que com a incorporação dos extratos associados aos óleos nas mantas poliméricas, houve uma diminuição significativa desses valores. Isso se deve a liberação controlada que as mantas poliméricas proporcionam, liberando de maneira controlada e direcionada os extratos metabólicos associados aos óleos essenciais.

6. Conclusão:

Inicialmente, buscou-se explorar isolar bactérias extraídas da planta *A. humile*, obtendo-se sessenta e cinco bactérias endofíticas de *A. humile*., distribuídas em ramos com 28 isolados e folhas com 37 isolados. Os ensaios *in vitro* de atividade enzimática confirmam que as bactérias endofíticas possui maior produção de enzimas amilolíticas. A avaliação dos antagonismos contra *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, demonstrou que apenas 4 isolados apresentaram atividade antagonica a todos os três microrganismos avaliados. De acordo com a identificação molecular do sequenciamento do gene 16S rDNA, os isolados endofíticos selecionados pertencem o gênero *Bacillus* e a espécie *amyloliquefaciens* e *subtilis*. A análise da curva de crescimento dos endofíticos do gênero *Bacillus* revelou padrões característicos que são essenciais para a compreensão de seu potencial biológico e industrial. A partir dessa avaliação, observou-se que o caldo fermentativo de ambos os isolados apresentou maior atividade inibitória entre 24 e 48 horas de fermentação.

Os testes de sinergismo entre os extratos metabólicos de endofíticos e óleos essenciais de cravo, limoneno e manjeriço, revelam que as combinações mais promissoras foram dos extratos com óleo essencial de limoneno para bactérias e de cravo para leveduras.

Considerando a citotoxicidade observadas nas amostras, a incorporação dos extratos metabólicos associados a óleos essenciais em mantas de fibras polímeros fabricados pela técnica de fiação por sopro em solução foi uma estratégia relevante. Essa abordagem não apenas ajudou a reduzir a toxicidade dos extratos, mas também permitiu a liberação controladas dos compostos. A incorporação nas mantas possibilitou uma possível aplicação em curativos de pele. As mantas apresentaram resultados positivos como homogeneidade de diâmetro e poucos defeitos.

Estudos *in vivo* das mantas ainda se fazem essenciais no futuro para uma possível aplicação em curativos. Para maiores especificidades, testes de identificação da composição dos metabolitos encontrados nos gêneros de *Bacillus* podem ser realizados, assim como teste de identificação da composição bioativas dos óleos essenciais. Os testes de estabilidade das mantas são imprescindíveis, visando avaliar quanto tempo as mantas mantêm suas propriedades físicas, químicas e funcionais dentro dos padrões de qualidade aceitáveis.

8. Referências:

- ABRAHAMIAN, F. M. et al. Omadacycline for Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Supplement_1, p. S23–S32, 1 ago. 2019.
- ACHAGAR, R. et al. A Comprehensive Review of Essential Oil–Nanotechnology Synergy for Advanced Dermocosmetic Delivery. **Cosmetics**, v. 11, n. 2, p. 48, 1 abr. 2024.
- ADEYEMI, S. B. et al. Polymeric nanoparticles for enhanced delivery and improved bioactivity of essential oils. **Heliyon**, v. 9, n. 6, p. e16543–e16543, 1 jun. 2023.
- ADRIELLE RODRIGUES COSTA et al. Influence of abiotic factors on phytochemical diversity of *Anacardium occidentale* L. **Food Bioscience**, v. 49, p. 101911–101911, 1 out. 2022.
- AHMAD-MANSOUR, N. et al. Staphylococcus Aureus Toxins: an Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, v. 13, n. 10, p. 677, 23 set. 2021.
- ALEXANDRE, B. A. et al. Production of a dressing with Ecovio® nanofibers produced by electrospinning containing garlic wood essential oil. **Journal of Molecular Liquids**, v. 435, n. 128126, p. 128126, out. 2025.
- ALVES, L. et al. Importance of Poly-3-Hydroxybutyrate Metabolism to the Ability of *Herbaspirillum Seropedicae* to Promote Plant Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 6, 7 jan. 2019.
- ALY, A. H. et al. Fungal Endophytes from Higher plants: a Prolific Source of Phytochemicals and Other Bioactive Natural Products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1–16, mar. 2010.
- AMBEKAR, R. S.; KANDASUBRAMANIAN, B. Advancements in Nanofibers for Wound dressing: a Review. **European Polymer Journal**, v. 117, p. 304–336, ago. 2019.
- ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; VANITHA, M. K. D-limonene: a Multifunctional Compound with Potent Therapeutic Effects. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 1, dez. 2020.
- ANDRADE, F. et al. Endophytic fungi-assisted biomass synthesis of eco-friendly formulated silver nanoparticles for enhanced antibacterial, antioxidant, and antidiabetic activities. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 97, p. 105749–105749, 6 maio 2024.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in Primary Health Care. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, 2014.
- ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220–243, abr. 2015.

ASCARI, M. et al. Physicochemical and Centesimal characterization, Bioactive compounds, and Medicinal Potential of *Anacardium Humile* A.St.-Hil.: a Comprehensive Review. **Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 13, p. e11550–e11550, 5 dez. 2024.

AURAS, R. **Poly(Lactic Acid)**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363–370, 1 jun. 2012.

BEIKZADEH, S. et al. Cellulose Acetate Electrospun Nanofibers Encapsulating Lemon Myrtle Essential Oil as Active Agent with Potent and Sustainable Antimicrobial Activity. **Reactive and Functional Polymers**, v. 157, n. 104769, p. 104769, dez. 2020.

BELL, C. R. et al. Endophytic Bacteria in Grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 46–53, 1 jan. 1995.

BENNETT, J. W.; CHUNG, K.-T. Alexander Fleming and the Discovery of Penicillin. **Advances in Applied Microbiology**, v. 49, p. 163–184, 2001.

BOGAS, A. C. et al. Endophytic fungi: an Overview on Biotechnological and Agronomic Potential. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 8 jun. 2022.

BRAGA, G. et al. Influence of Lamotrigine concentration on physicochemical properties and transdermal release using PBAT/PLA electrospun fibers. **Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 686, n. 133216, p. 133216–133216, 13 jan. 2024.

BRITO, S.; BAEK, M.; BIN, B.-H. Skin Structure, Physiology, and Pathology in Topical and Transdermal Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 11, p. 1403–1403, 31 out. 2024.

BROOK, I. Anaerobic Infections in Children. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 12, p. 1271–1280, out. 2002.

CARDOSO, V. M. et al. Biotechnological applications of the medicinal plant *Pseudobrickellia brasiliensis* and its isolated endophytic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 926–934, 3 maio 2020.

CARVALHO, B. M. et al. Ecovio®-based nanofibers as a potential fast transdermal releaser of aceclofenac. **Journal of Molecular Liquids**, v. 325, p. 115206, mar. 2021.

CARVALHO, T.; DER, V. Evaluation of Antimicrobial Activity of the Endophytic Actinomycete R18(6) against Multiresistant Gram-negative Bacteria. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 88, n. 1, p. 155–163, 4 fev. 2016.

CHAKRAVORTY, S. et al. A Detailed Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, maio 2007.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CLÁUDIA, N. et al. The Importance of Home Gardens for the Conservation of Knowledge and Practices about Medicinal Plants in an Environmental Protection Area in the Atlantic Forest of the State of Rio De Janeiro, Brazil. **Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 22, n. 4, p. 451–471, 30 jul. 2023.

CORNIA, P. B.; DAVIDSON, H. L.; LIPSKY, B. A. The evaluation and treatment of complicated skin and skin structure infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 5, p. 717–730, 17 mar. 2008.

DADOL, G. C. et al. Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: Materials, methods, and applications. **Materials Today Communications**, v. 25, n. 2, p. 101656, 1 dez. 2020.

DE A ROYO, V. et al. Anatomy, Histochemistry, and Antifungal Activity of *Anacardium humile* (Anacardiaceae) Leaf. **Microscopy and Microanalysis**, v. 21, n. 6, p. 1549–1561, 20 nov. 2015.

DE PAULA NOGUEIRA CRUZ, F. et al. Discovery of a Novel Lineage *Burkholderia cepacia* ST 1870 Endophytically Isolated from Medicinal *Polygala paniculata* Which Shows Potent In Vitro Antileishmanial and Antimicrobial Effects. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, n. 6618559, p. e6618559, 17 fev. 2021.

DE SOUZA, B. Z. et al. Electrospun Fibers of Ecovio® Polymer Blends with Antimicrobial Tea Tree Essential Oil: Enhanced Chemical and Biological Properties. **Processes**, v. 12, n. 11, p. 2330, 24 out. 2024.

DEB, P. et al. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 154, 2013.

DIALLO, O. O. et al. Antibiotic Resistance Surveillance systems: a Review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 430–438, nov. 2020.

ESPOSITO, E.; JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO. **Fungos : Uma Introdução À biologia, Bioquímica E Biotecnologia**. Caxias Do Sul: EducS, 2004.

EVANGELISTA, S. S.; KATYÚSCYA VELOSO LEÃO. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO USO MEDICINAL DAS FOLHAS, CASCA E CAULE DA ESPÉCIE ANACADIUM HUMILE A. ST-HIL.AA. **Revista Multidisciplinar Em Saúde** , v. 2, n. 3, 1 out. 2021.

EYJI SANO, E.; ROSA, R. **Mapeamento Do Uso Do Solo E Cobertura Vegetal - Bioma Cerrado Ano - Base 2002**. [s.l.] Ministerio Do Meio Ambiente Secretaria De Biodiversidade E Florestas, 2002.

FAROUK, H. M. et al. Bioactivity of crude extract produced by endophytic fungi isolated from *Ziziphus spina-christi* (Nabq) leaves for antimicrobial evaluation as well as optimization of culture medium conditions. **South African Journal of Botany**, v. 162, n. 873-884, p. 873–884, 12 out. 2023.

FDA. **US Food and Drug Administration**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/>>.

FERREIRA, P. R. B. et al. Antibacterial Activity tannin-rich Fraction from Leaves of *Anacardium Humile*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1861–1864, 28 ago. 2012.

GAUTAM, V. S. et al. Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of an endophytic fungus *Nigrospora sphaerica* (EHL2), inhabiting the medicinal plant *Euphorbia hirta* (dudhi) L. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 2, 17 jan. 2022.

GRANATO, A. C. et al. Comparison of growth methods and biological activities of brazilian marine *Streptomyces*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 125–131, 1 mar. 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

GUIMARÃES, A. C. et al. Endophytic Mycobiota Characterization of the Amazonian Mistletoe *Cladocolea micrantha* Hosted in Cashew Tree. **American Journal of Plant Sciences**, v. 04, n. 04, p. 917–921, 1 jan. 2013.

GUSMÃO, A. P. et al. Characterization of Microfibers of Carbon Nanotubes Obtained by Electrospinning for Use in Electrochemical Sensor. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, n. 5, p. 1551–1565, 24 nov. 2020.

HADIDI, M. et al. Chitosan Nanoparticles Loaded with Clove Essential oil: Characterization, Antioxidant and Antibacterial Activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, n. 116075, p. 116075, maio 2020.

HAYFA ARGUI et al. Preparation of cypress (*Cupressus sempervirens* L.) essential oil loaded poly(lactic acid) nanofibers. **Open Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 796–805, 1 jan. 2021.

HE, D. et al. Synergistic activity of clove essential oil and thyme essential oil and their interaction against *Malassezia furfur*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. **LWT**, v. 204, p. 116431, jul. 2024.

HOSSEIN OMIDIAN; CUBEDDU, L. X.; GILL, E. J. Harnessing Nanotechnology to Enhance Essential Oil Applications. **Molecules**, v. 30, n. 3, p. 520–520, 24 jan. 2025.

IVANOVA, V. et al. HPLC study of starch hydrolysis products obtained with α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 193–202, ago. 1991.

JIANG, L.; WOLCOTT, M. P.; ZHANG, J. Study of Biodegradable Polylactide/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 1, p. 199–207, 23 nov. 2005.

KARIMI, N. Approaches in line with human physiology to prevent skin aging. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 25 out. 2023.

KHAN, Z. H. et al. Introduction to Nanomaterials. **Advanced structured materials**, v. 79, p. 1–23, 1 jan. 2016.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, maio 2011.

KUREČIČ, M.; SFILIGOJ SMOLE, M. Electrospinning: Nanofibre Production Method. **Tekstilec**, v. 56, n. 1, p. 4–12, 10 mar. 2013.

L. BOLFE, E. **DINÂMICA AGRÍCOLA NO CERRADO: Análise E Projeções**, [s.l.] Édson Luis Bolfe, Edson Eyije Sano, Silvia Kanadani Campos, 2020.

LASPRILLA, A. J. R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321–328, jan. 2012.

LAUBE, S. Skin Infections and Ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 3, n. 1, p. 69–89, jan. 2004.

LEBRAZI, S. et al. Investigating the Synergistic Action of Three Essential Oils for Antibacterial and Antioxidant Applications: a Comprehensive Framework Using Mixture Design, Artificial Neural Networks, and in Silico Methods. **Food Bioscience**, v. 67, n. 106250, p. 106250–106250, 1 mar. 2025.

LETÍCIA, A. et al. **Bioprocessos E Biotecnologia**. [s.l.] Fernando Santos Ana Lúcia Kern Jane Marlei Boeira Odir Dellagostin, 2022.

LI, Y.; TANG, C.; HE, Q. Effect of orange (*Citrus sinensis* L.) peel essential oil on characteristics of blend films based on chitosan and fish skin gelatin. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100927, jun. 2021.

LIMA JÚNIOR, J. P. DE et al. Anacardium humile St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and α -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, n. 113667, p. 113667, mar. 2021.

LIMA NETO, G. A. et al. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1069–1077, 2015.

LIN, L.-Z. et al. Isolation and Characterization of Fengycins Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 and Its Broad-Spectrum Antimicrobial Potential Against Multidrug-Resistant Foodborne Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 18 dez. 2020.

LIU, G. et al. Enhanced lignocellulose degradation in *Bacillus subtilis* RLI2019 through CRISPR/Cas9-mediated chromosomal integration of ternary cellulase genes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 306, p. 141727, maio 2025.

LIU, K. et al. Bacteriophage therapy for drug-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, 31 jan. 2024.

LUIZ-FERREIRA, A. et al. Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agent? A scientific approach to the traditional knowledge. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 207–209, 5 dez. 2007.

LUIZ-FERREIRA, A. et al. Mechanisms of the Gastric Antiulcerogenic Activity of *Anacardium humile* St. Hil on Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal Injury in Rats. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7153–7166, 15 out. 2010.

LUIZA AMIM MERCANTE; DANIEL SOUZA CORRÊA. **Eletrofição e nanofibras: fundamentos e aplicações**. [s.l: s.n.].

MA, C. C. et al. Early Division of the Paramedian Forehead Flap: A Systematic Review and Retrospective Analysis. **The Laryngoscope**, v. 135, n. 7, 27 jan. 2025.

MADDALA, V. K. S.; SINGH, S. Essential Oils from Plants and Their Role in Nanomaterial Synthesis Characterization and Applications. **Secondary Metabolites Based Green Synthesis of Nanomaterials and Their Applications**, p. 191–207, 2023.

MAGHFIROH, K. et al. Antibacterial activity of encapsulated essential oil from *Citrus aurantifolia* peel into chicken eggshell-derived hydroxyapatite. **Chemical Data Collections**, v. 57, n. 101188, p. 101188, jun. 2025.

MAHESHIKA SETHUNGA et al. Synergistic antimicrobial activity of essential oils and oleoresins of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), clove bud (*Syzygium aromaticum*) and ginger (*Zingiber officinale*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 51, p. 102800–102800, 1 ago. 2023.

MALA, K. et al. The Epidemiology of Repeatedly Positive Bacterial Skin Infections in Auckland Children, New Zealand. **Journal of Infection**, v. 90, n. 5, p. 106484, 9 abr. 2025.

MANAM, M.; SRIVATSA, S.; OSBORNE, W. J. Endophytic bacteria of *Gracilaria edulis* in combating human bacterial pathogens by PPDHMP – A crude to single molecule product development approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 202, n. 107431, p. 107431, maio 2025.

MANION, C. R.; WIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 74, n. 9, p. e153–e162, 1 maio 2017.

MARTINS, A. G. L. DE A. et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1791–1796, 20 ago. 2010.

MARWA JARDAK et al. Control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by surfactins of an endophytic bacterium *Bacillus* sp. 15 F. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 180, p. 110477–110477, 3 jul. 2024.

MATEUS LIMA ALMEIDA et al. Resistência bacteriana: uma ameaça global. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 5, p. 19741–19748, 6 set. 2023.

MATSUMOTO, A.; TAKAHASHI, Y. Endophytic actinomycetes: Promising Source of Novel Bioactive Compounds. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 514–519, 8 mar. 2017.

MAY, A. K. Skin and Soft Tissue Infections. **Surgical Clinics of North America**, v. 89, n. 2, p. 403–420, abr. 2009.

MAYILA TUERDIBIEKE et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Alhagi sparsifolia* Shap. and their antibacterial activity. **Heliyon**, v. 10, n. 19, p. e39003–e39003, 1 out. 2024.

MENDES, J. F. et al. Obtaining poly (lactic acid) nanofibers encapsulated with peppermint essential oil as potential packaging via solution-blow-spinning. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 230, p. 123424–123424, 25 jan. 2023.

- MERCANTE, L. A.; CORRÊA, D. S. **Eletrofição E nanofibras: Fundamentos E Aplicações**. [s.l.] Atena, 2023.
- MILLER SANTOS FERREIRA et al. Systematic Review of Anti-inflammatory Agents from *Aspergillus* Species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 519–530, 18 ago. 2021.
- MONTANARI, R. M. et al. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9728–9740, 14 ago. 2012.
- MONTERO RECALDE, M. et al. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 29, n. 2, p. 588–593, 31 maio 2018.
- NAHAS, E. O. et al. From Emulsions to Films: the Role of Polysaccharide Matrices in Essential Oil Retention within Active Packaging Films. **Foods**, v. 14, n. 9, p. 1501–1501, 25 abr. 2025.
- NARAYANAN, M. et al. Synthesis of TiO₂ nanoparticles using endophytic *Streptomyces zaomyceticus* MNDV: Characterization and evaluation of antibacterial, antioxidant, antidiabetic and photocatalytic properties. **Inorganic Chemistry Communications**, p. 113560–113560, 1 nov. 2024.
- NARAYANANKUTTY, A. et al. Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Bacterial, and Anti-Cancer Activities of Essential Oils Extracted from Citrus Limetta Risso Peel Waste Remains after Commercial Use. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8329, 29 nov. 2022.
- NATALIA PIMENTEL ESPOSITO-POLESI. Contaminação versus Manifestação endofítica: Implicações No Cultivo in Vitro De Plantas. **Rodriguésia**, v. 71, 1 jan. 2020.
- NAVEEN, K. V. et al. Fabrication of mycogenic silver nanoparticles using endophytic fungal extract and their characterization, antibacterial and cytotoxic activities. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 128, n. 108575, p. 108575, jun. 2021.
- NEGI, S.; KUMAR SRIVASTAV, A.; BALA, L. **Aromatherapy: the Science of Essential Oils**. [s.l.] Pradeep Kumar Shukla, Ajjeta Kumar Srivastav, 2024.
- NEHME, R. et al. The effects of *Thymus capitatus* essential oil topical application on milk quality: a systems biology approach. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, 7 fev. 2025.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and Epiphytic Microbes as "Sources" of Bioactive Agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, 22 maio 2015.

- NIGUSSIE, D. et al. Systematic Review of Ethiopian Medicinal Plants Used for Their anti-inflammatory and Wound Healing Activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 276, p. 114179, ago. 2021.
- NISAR, T. et al. Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 670–680, jan. 2018.
- NORILER, S. A. et al. Bioprospecting and Structure of Fungal Endophyte Communities Found in the Brazilian Biomes, Pantanal, and Cerrado. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 24 jul. 2018.
- OGOFURE, A. G.; GREEN, E. Bioactivity and metabolic profiling of crude extracts from endophytic bacteria linked to *Solanum mauritianum* Scop: Discovery of Antibacterial and Anticancer Properties. **Heliyon**, v. 11, n. 2, p. e40525–e40525, 20 nov. 2024.
- OLIVEIRA, A. L. D. et al. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA a ANTIBIÓTICOS NA INFECÇÃO URINÁRIA. **Uningá Review**, v. 20, n. 3, 10 dez. 2014.
- OLIVEIRA, L. et al. Combining Electrospun Nanofibers, *Paenibacillus polymyxa* Fermented Broth, and Silver Nanoparticles for Enhanced Antimicrobial Materials. **BioNanoScience**, v. 15, n. 3, 21 maio 2025.
- OLIVEIRA, M.; AL, E. **Farmacognosia : Da Planta Ao Medicamento**. Florianópolis: Editora Da Ufsc ; Porto Alegre Editora Da Ufrgs, 2007.
- ORHAN, E.; OMAI, D.; GÜVENLİR, Y. Partial Purification and Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1-3, p. 0183–0194, 2005.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos Para Avaliação Da Atividade Antimicrobiana E Determinação Da Concentração Mínima Inibitória (CMI) De Plantas Medicinais. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, jun. 2008.
- OZCAN, I. et al. Characterization of Solution Blow Spun Poly(Lactic) Acid Based Nanofibers Containing Sucuk Spice Mix Essential Oils. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 31, n. 6, p. 2334–2346, 13 jan. 2023.
- PADHAN, D.; PATTAIK, S.; BEHERA, A. K. Growth-arresting Activity of *Acmella* Essential Oil and Its Isolated Component D-Limonene (1, 8 P-Mentha diene) against *Trichophyton Rubrum* (Microbial Type Culture Collection 296). **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 51, p. 555–555, 1 jan. 2017.

PAIVA, C.; GONZAGA, F.; LACAVALA, P. T. Endophytic Microorganisms of the Tropical Savannah: a Promising Source of Bioactive Molecules. **Springer eBooks**, p. 57–70, 1 jan. 2017.

PAN, J. et al. Biological properties of essential oil emphasized on the feasibility as antibiotic substitute in feedstuff. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 6, n. 1, nov. 2022.

PARENTE, L. M. L. et al. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da Calendula officinalis L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 383–391, 2009.

PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P.; HEIL, M. The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? **Frontiers in Plant Science**, v. 2, 2011.

PEREIRA, E. et al. In vitro Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. **Planta Medica**, v. 77, n. 04, p. 401–404, 22 set. 2010.

Plantas do Pantanal. Disponível em:

<<https://www.cpap.embrapa.br/plantas/ficha.php?especie=Anacardium+humile+St.+Hil.>>

Acesso em: 16 maio. 2025.

PRADO, L. R. et al. INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SÍNTESE PARA A PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO. p. 13902–13909, 1 fev. 2015.

PURUSOTTAM MAJHI et al. Fungal Endophytes: An Insight into Diversity, Stress Tolerance, Biocontrol and Plant Growth-Promoting Potentials. **Current Microbiology**, v. 82, n. 6, 7 maio 2025.

QIAO, Z. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using a novel endophytic fungus *Letendreaea* sp. WZ07: Characterization and evaluation of antioxidant, antibacterial and catalytic activities (3-in-1 system). **Inorganic Chemistry Communications**, v. 138, p. 109301–109301, 1 abr. 2022.

RAJ, G. et al. Isolation, identification and bioprospecting potential of *Bacillus subtilis*, endophytic bacterium from *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lam. ex Savigny. **Microbial Pathogenesis**, v. 203, n. 107458, p. 107458–107458, 1 mar. 2025.

RAND, K. H.; TILLAN, M. Errors in Interpretation of Gram Stains From Positive Blood Cultures. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 126, n. 5, p. 686–690, nov. 2006.

RASIYA K.T; SEBASTIAN, D. Iturin and surfactin from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* strain RKEA3 exhibits antagonism against *Staphylococcus aureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, p. 102125–102125, 9 ago. 2021.

- SALTZMAN, B. E. Colorimetric Microdetermination of Nitrogen Dioxide in Atmosphere. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 1949–1955, dez. 1954.
- SANTOS, F. N. DOS et al. Orange peel essential oil in rice starch encapsulating material for antimicrobial application against *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 289, p. 138955, fev. 2025.
- SAUCEDO-ZUÑIGA, J. N. et al. Controlled Release of Essential Oils Using Laminar Nanoclay and Porous Halloysite / Essential Oil Composites in a Multilayer Film Reservoir. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 316, n. 10882, p. 110882, mar. 2021.
- SELIM, H. M. R. M. et al. Myco-fabricated CuO NPs and chitosan-conjugated CuO nanoparticles using endophytic *Aspergillus* sp. JAWF3: Targeting *E. coli* outer membrane for enhanced antibacterial and biofilm inhibition. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 178, p. 114361, ago. 2025.
- SERRANO, N. F. G. et al. Purification and characterization of two new antimicrobial molecules produced by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 93, n. 3, p. e20200486, 2021.
- SK, M. S. et al. Solution Blow Spinning: An Emerging Nanomaterials-Based Wound-Care Technology. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 113, n. 2, 24 jan. 2025.
- SKREIBERG, A. et al. TGA and macro-TGA characterisation of biomass fuels and fuel mixtures. **Fuel**, v. 90, n. 6, p. 2182–2197, jun. 2011.
- SOUSA, M. D. B. et al. Red biocolorant from endophytic *Talaromyces minnesotensis*: production, properties, and potential applications. **Springer Link**, v. 107, n. 11, p. 3699–3716, 21 abr. 2023.
- STROBEL, G. Harnessing Endophytes for Industrial Microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 240–244, jun. 2006.
- TARHAN, İ. et al. Rapid determination of adulteration of clove essential oil with benzyl alcohol and ethyl acetate: Towards quality control analysis by FTIR with chemometrics. **Vibrational Spectroscopy**, v. 118, p. 103339, jan. 2022.
- TATIANE BELLINCANTA et al. Preparação e caracterização de membranas poliméricas a partir da blenda polisulfona/poliuretano. **Polímeros**, v. 21, n. 3, p. 229–232, 7 jul. 2011.
- TIWARI, S.; DUBEY, N. K. Phytochemical Evaluation and Biological Activity of *Syzygium Aromaticum* L. Essential Oil. **Apple Academic Press eBooks**, p. 371–389, 22 jun. 2022.

- TOGHUEO, R. M. K. Anti-leishmanial and Anti-inflammatory Agents from Endophytes: a Review. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 5, p. 311–328, 28 set. 2019.
- TUMAH, H. N. Bacterial Biocide Resistance. **Journal of Chemotherapy**, v. 21, n. 1, p. 5–15, fev. 2009.
- UGBOGU, O. C. et al. A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Heliyon**, v. 7, n. 11, p. e08404, nov. 2021.
- UNALAN, I. et al. Evaluation of Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone)/Gelatin Nanofiber Mats Containing Clove Essential Oil for Antibacterial Wound Dressing. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 570, 1 nov. 2019.
- URZÊDA, M. A. et al. Evaluation of the Hypoglycemic Properties of *Anacardium humile* Aqueous Extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–8, 1 jan. 2013.
- VALE, H. M. M. DO et al. Yeasts in native fruits from Brazilian neotropical savannah: occurrence, diversity and enzymatic potential. **Biota Neotropica**, v. 21, n. 4, 2021.
- WAGHMARE, J. S. A PEDICULICIDAL ACTIVITY OF CLOVE OIL. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 2, 1 fev. 2015.
- WANG, Y. et al. Purification and characterization of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* and their antibacterial effects on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Process Biochemistry**, v. 146, p. 44–55, 28 jun. 2024.
- WISBECK, E.; ROBERT, A. P.; FURLAN, S. A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. v. 3, n. 2, 19 maio 2009.
- WONG, F. et al. Discovery of a structural class of antibiotics with explainable deep learning. **Nature**, v. 626, p. 177–185, 20 dez. 2023.
- WU, H. et al. Incorporation of cellulose nanocrystals to improve the physicochemical and bioactive properties of pectin-konjac glucomannan composite films containing clove essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 260, p. 129469–129469, 17 jan. 2024.
- XIE, Y. et al. Cadmium biosorption and mechanism investigation using a novel *Bacillus subtilis* KC6 isolated from pyrite mine. **Journal of Cleaner Production**, v. 312, p. 127749, 4 jun. 2021.
- XU, T. et al. Molecular Simulations in Elucidating the Unique Behaviors of Polymers Induced by Chain Connectivity: A Personal Review. **Polymer**, v. 125, p. 128480, maio 2025.

YADAV, A. et al. Antifungal resistance in dermatophytes: Essential oil-based nanoformulations as new generation therapeutics against dermatophytes. **Microbial Pathogenesis**, v. 205, n. 107622, p. 107622, ago. 2025.

YANG, H. et al. Investigation and analysis of the characteristics and drug sensitivity of bacteria in skin ulcer infections. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 20, n. 4, p. 194–197, 1 ago. 2017.

YANG, S. et al. Oriented Cell division: New Roles in Guiding Skin Wound Repair and Regeneration. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 6, 1 dez. 2015.

ZHANG, C. Biodegradable Polyesters: Synthesis, Properties, Applications. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA eBooks**, v. 12, p. 1–24, 13 mar. 2015.