



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO *Rhizopus sp.*

São Luís-MA

2024

VALÉRIA MARIA SOUSA LEITÃO

BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO *Rhizopus sp.*

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia no polo da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de DOUTOR em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Coorientadora: Dra Amanda Mara Teles

Coorientadora: Dra Flávia Castelo Branco Vidal Cabral

São Luís-MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Leitão, Valéria Maria Sousa.

BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO *Rhizopus* sp /
Valéria Maria Sousa Leitão. - 2024.

146 p.

Coorientador(a) 1: Amanda Mara Teles.

Coorientador(a) 2: Flávia Castelo Branco Vidal Cabral.

Orientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão

Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís - Ma, 2024.

1. *Rhizopus*. 2. Metabólitos Secundários. 3. Câncer
Cervical. 4. Células Hela. 5. Microemulsão. I. Cabral,
Flávia Castelo Branco Vidal. II. Nascimento, Maria do
Desterro Soares Brandão. III. Teles, Amanda Mara. IV.



Universidade Federal do Maranhão
Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805 Telefone: (98)
3272-8000 E-mail: renorbio@ufma.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DA TESE

ALUNO: Valéria Maria Sousa Leitão

TÍTULO DO PROJETO: BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO *Rhizopus sp.*

PROFESSORA ORIENTADORA: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

BANCA EXAMINADORA	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento UFMA – Orientadora- Presidente	_____	_____
Profa. Dra. Amanda Mara Teles UEMA – Coorientadora	_____	_____
Profa. Dra. Flávia Castelo Branco Vidal Cabral UFMA – Coorientadora	_____	_____
Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes UFMA – Titular	_____	_____
Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa UFMA – Titular	_____	_____
Profa. Dra. Maria Célia Pires Costa UEMA – Titular	_____	_____
Profa. Dra. Cristina de Andrade Monteiro UFMA – Titular	_____	_____
Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra UFMA – Suplente	_____	_____
Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva UFMA – Suplente	_____	_____
Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva UFMA – Suplente	_____	_____
Profa. Dra. Raquel Maria Trindade Fernandes UEMA – Suplente	_____	_____
Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade UFMA – Suplente	_____	_____

DATA DA APROVAÇÃO:

HORÁRIO:

LOCAL:

VALÉRIA MARIA SOUSA LEITÃO

BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO *Rhizopus sp.*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia-Área de Concentração em Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em : de de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
UFMA - Orientadora

Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes
UFMA – 1º Examinador

Profa. Dra. Raquel Maria Trindade Fernandes
UEMA - 2º Examinador

Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes
UFMA – 1º Examinador

Profa. Dra. Maria Célia Pires Costa
UEMA - 3º Examinador

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa
UFMA - 4º Examinador

*Aos meus amados filhos, Murilo Leitão (4 anos) e
Manuela Leitão (2 anos) que durante a minha inserção no
programa de doutorado, por vezes privados da presença da mãe,
em outras, desfrutaram de uma presença menos disposta para as
atividades que a infância requer.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de um novo nascimento, mediante a sua graça e misericórdia.

Agradeço à minha querida mãe (Maria do Perpétuo Socorro Santos Souza) que sempre soube o valor da educação, e frente à tantas dificuldades, priorizou escolas de boa qualidade para todos os seus filhos. Sempre foi o meu suporte maior desde a graduação, residência, mestrado e doutorado.

Agradeço ao meu pai, José Maria Leitão (*in memorian*), que embora tenha nos deixado tão prematuramente, seus anos de trabalho e dedicação nos proveu sustento e educação até a maioridade.

Agradeço ao meu padrasto, Carlos Augusto Rabelo, sempre incentivador na educação e nos princípios de compromisso e honestidade.

Agradeço à Prof^ª Dr^ª Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento, coração dessa pesquisa, e que há muito luta entre tantas dificuldades no ensino público superior em amor ao Ensino, Pesquisa e Extensão. As portas que me foram abertas em minha vida profissional, tinha a projeção da sua mão. Sua vida de dedicação à Pesquisa Científica nos permitiu concluir este trabalho, pois sem a construção de inúmeras parcerias fora do nosso Campus Universitário, não teríamos logrado êxito. Sou grata à Deus pois desde o terceiro período da graduação fui adotada por ela, uma mãe na minha vida acadêmica.

Agradeço a professora Geusa Felipa de Barros Bezerra, braço forte que sustentou a mim e muitos outros alunos envolvidos na graduação e pesquisa no NIBA.

Agradeço a Amanda Mara Teles pois sempre solícita e preparada na condução e esclarecimentos de dúvidas no processo. Pegou na minha mão como um adulto conduz uma criança em um caminho que nunca trilhou.

Agradeço a Flávia Castelo Branco Vidal Cabral pela orientação segura e capaz nos meus primeiros anos de inserção no programa.

Agradeço às parcerias sem as quais não seria possível a realização deste trabalho nas pessoas Arlan Silva Freitas (Docente IFMA), Matheus Filipe Leitão de Oliveira (Discente IFMA), professor Marcelo Souza de Andrade (UFMA-PPGSAD), Carolina Borges Cordeiro (UEMA-Caxias), Wanderson Romão (Docente UFES), André Luís Menezes da (Docente UFPI), Matheus Oliveira do Nascimento (Doutorando PPGCF / UFPI), Pablo de Matos Monteiro (UFMA), Marcos Valério Vieira Lyrio (UFES) e Gabriela Vanini (UFRJ).

Agradeço a Anna Cynthia pela parceria na realização das disciplinas no programa, nas duplas formadas para realização de atividades, bem como o apoio nos recordatórios de tantas atividades a serem entregues.

Agradeço Kenia, Rita, Kátia e Diamantino pela grande ajuda nas fases iniciais da pesquisa. Em especial à Edna, que embora não tenha colaborado diretamente na pesquisa, ajudou a mim desde a graduação, como a tantos outros que passaram pelo NIBA.

Agradeço a todos os professores e demais profissionais, que contribuíram na formação do meu caráter e no meu desempenho profissional.

Agradeço à UFMG e USP-RP por terem colocado bases sólidas para realização deste doutoramento.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão, que guiou os meus primeiros passos na minha formação enquanto médica, me acolheu como docente, e continua alavancando o meu processo formativo.

Agradeço à CAPES FINANCE CODE 001.

“E a vida eterna é esta: que te conheçam a ti, o único Deus verdadeiro, e a Jesus Cristo, a quem enviaste.”

João 17:3

RESUMO

Introdução: Os fungos têm sido reconhecidos como uma grande fonte de metabólitos bioativos com grande aplicabilidade médica e farmacêutica. O *Rhizopus* sp possui aplicações de uso na indústria alimentícia para biovalorização de produtos. **Objetivos:** Produzir extrato fúngico a partir do *Rhizopus* sp; identificar metabólitos secundários obtidos a partir do extrato; preparar microemulsão a partir do extrato de *Rhizopus* sp; caracterizar a atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica frente as linhagens tumorais de adenocarcinoma cervical (HeLa e SiHa), células Vero, Caco-2, PC-3 e B16-F10. **Metodologia:** Os extratos de *Rhizopus* sp extracelulares (caldo) e intracelular (biomassa micelial) foram liofilizados, este último foi incorporado a uma microemulsão. A espectrometria de massa (Orbitrap-MS) identificou os metabólitos presentes no extrato biomassa. A determinação de fenólicos totais e flavonoides se deu pelo método colorimétrico quantitativo utilizando como padrão o ácido gálico e a quercetina. A atividade antimicrobiana foi avaliada verificando-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, assim como foi verificado CIM e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método ABTS e DPPH. Utilizando-se como padrão o trolox. O MTT para atividade citotóxica. **Resultados:** Foram obtidos 13 metabólitos destacando-se o sorbitol, ácido linoléico, ácido oléico, ácido palmítico e ácido esteárico. A Microemulsão com biomassa de *Rhizopus* sp exibiu a maior quantidade de flavonoides e compostos fenólicos totais, comparando com o extrato biomassa (intracelular) de *Rhizopus* sp e o extrato extracelular de *Rhizopus* sp. A microemulsão formulada com extrato biomassa foi o subproduto que mais se aproximou do controle (gentamicina), e que também se mostrou com maior atividade antioxidante. Os extratos revelaram forte/ótima ação antifúngica contra diferentes espécies de cândida, otimizada na formulação da microemulsão. O extrato biomassa revelou efeito citotóxico nas células HeLa (IC50 de 56,22 µg/mL). **Conclusão:** O fungo *Rhizopus* sp se constitui como uma rica fonte de metabólitos secundários com potencial atividade farmacológica que incluem efeitos antimicrobianos, antioxidantes e citotóxica relacionada ao câncer de colo do útero. A microemulsão se mostrou com uma apresentação farmacológica eficaz na preservação dos metabólitos obtidos do extrato fúngico, e ainda potencializadora em todas as atividades avaliadas exceto na atividade antitumoral.

Palavras chave: *Rhizopus*; Metabólitos secundários; Câncer cervical; Células HeLa; Microemulsão.

ABSTRACT

Introduction: Fungi are recognized as a great source of bioactive metabolites with great medical and pharmaceutical applicability. *Rhizopus* sp has applications in the food industry for bioevaluation of products. **Objectives:** Produce fungal extract from *Rhizopus* sp identify secondary metabolites obtained from the extract; microemulsion preparation from *Rhizopus* sp extract to characterize the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity against cervical adenocarcinoma tumor lines (HeLa and SiHa), Vero, Caco-2, PC-3 and B16-F10 cells. **Methodology:** The extracellular (oil) and intracellular (mycelial biomass) extracts were lyophilized, the latter incorporated into microemulsion. Mass spectrometry (Orbitrap-MS) combined the metabolites present in the biomass extract. The determination of phenolics is determined using the Folin-Ciocalteu quantitative colorimetric method; The antimicrobial activity was evaluated against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Antioxidant activity was evaluated using the ABTS and DPPH method. The MTT for cytotoxic activity. **Results:** 13 metabolites were obtained, highlighting sorbitol, linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and stearic acid. The Microemulsion with *Rhizopus* sp Biomass exhibited a higher amount of flavonoids and total phenolic compounds, compared to the biomass extract of *Rhizopus* sp and the extracellular extract of *Rhizopus* sp. The microemulsion formulated with biomass extract was the byproduct that changed the most from the control (gentamicin), and which also showed greater antioxidant activity. The extracts revealed strong/great antifungal action against different species of candida, optimized in the microemulsion formulation. The biomass extract revealed a cytotoxic effect on HeLa cells (IC₅₀ of 56.22 µg/mL). **Conclusion:** The fungus *Rhizopus* sp constitutes a rich source of secondary metabolites with potential pharmacological activity that includes antimicrobial, antioxidant and cytotoxic effects related to cervical cancer. The microemulsion was shown to have an effective pharmacological presentation in preserving the metabolites obtained from the fungal extract, and also potentiating all evaluated activities except antitumor activity.

Keywords: *Rhizopus*; Secondary metabolites; Cervical cancer; HeLa cells; Microemulsion

Lista de ilustrações

- Figura 1.** Tubo de ensaio com colônia de *Rhizopus* sp. 41
- Figura 2.** Colônia *Rhizopus* sp (placa de petri) - 3^o e 5^o dia de crescimento. 42
- Figura 3.** Adição de fragmentos da colônia de *Rhizopus* sp em Caldo Sabouraud Dextrose. 43
- Figura 4.** Filtração do extrato após 22 dias e produção do Extrato de *Rhizopus* sp (extracelular) Micélio *Rhizopus* sp (intracelular). 43
- Figura 5.** Extrato de *Rhizopus* sp (extracelular) filtrado e acrescido de etanol (A), após acréscimo de etanol ficou em agitação por 24h (B), fase orgânica (Acetato de etila) foi concentrada em evaporador rotatório (C). 44
- Figura 6.** Microemulsões obtidas com diferentes concentrações do miristato de isopropila, e uma fase surfactante/cosurfactante (proporção de 3:1). A-Emulsão. B-formação de fases. C-formação de gel. D-Microemulsão. 45
- Figura 7.** Identificação Macroscópica do *Rhizopus*- (A) Colônia em PDA com abundante micélio algodoado, (B) Colônia com esporângios pretos. 53
- Figura 8.** Identificação Microscópica de *Rhizopus* sp. (A) Esporângios globosos multiesporados preto (B) Esporangióforo e columela subglobosa a globosa (C) Esporangiósporos e Rhizóide basal. 53
- Figura 9.** Gel de eletroforese a 1,5% contendo amostras do gênero *Rhizopus* sp. e espécie *Penicillium citrinum*. 54

Figura 10. Espectro de massas ESI (+) Orbitrap-MS realizado no extrato de fungo de <i>Rhizopus</i> sp.	55
Figura 11. Diagrama de fase pseudoternário de óleo (miristato de isopropila), teansoativo (Tween 80/álcool iso-propílico, na proporção de 3:1) e fase aquosas.	57
Figura 12. Gráfico de porcentagem de morte celular em células Vero do extrato de <i>Rhizopus</i> sp caldo em 24 horas de incubação.	69
Figura 13. Gráfico de porcentagem de morte celular em células HeLa do extrato.	69

Lista de tabelas

Tabela 1: Medicamentos aprovados de origem fúngica, incluindo a molécula original do produto natural e, quando relevante, os seus derivados sintéticos.	22
Tabela 2: Tipos histopatológicos do câncer de colo do útero.	29
Tabela 3: Estadiamento do câncer de colo do útero.	32
Tabela 4. Compostos identificados no ESI (-) Orbitrap-MS realizado no extrato de fungo de <i>Rhizopus</i> sp.	56
Tabela 5. Valores de tamanho de partículas, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta das microemulsões incorporada por extrato de <i>Rhizopus</i> sp (MR) e sem a incorporação (MB).	58
Tabela 6. Avaliação macroscópica da microemulsões obtidas incorporada por extrato de <i>Rhizopus</i> sp (MR) e sem a incorporação (MB).	59
Tabela 7. Análises quanto ao pH, condutividade e índice de refração da microemulsões obtidas incorporada por extrato de <i>Rhizopus</i> sp (MR) e sem a incorporação (MB).	60
Tabela 8. Teores de compostos fenólicos totais extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp em diferentes culturas bacterianas após 24 h de tratamento.	61
Tabela 9. Concentração inibitória mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp em diferentes culturas bacterianas após 24 h de tratamento.	62

Tabela 10. Concentração Bactericida Mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> em diferentes culturas de bactérias após 24 h de tratamento.	63
Tabela 11. Concentração inibitória mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp em diferentes culturas de leveduras após 24 h de tratamento.	64
Tabela 12. Concentração Fungicida mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> em diferentes culturas de leveduras após 24 h de tratamento	65
Tabela 13. Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp pelo método do DPPH e ABTS.	66
Tabela 14. Atividade antioxidante da concentração efetiva de 50% (EC50) extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp pelo método do DPPH e ABTS	67
Tabela 15 – Viabilidade celular pelo método de MTT nas linhagens celulares Vero, HeLa, PC-3 e B16-F10. Dados expressos em valores de CI ₅₀ (µg/mL), após 24 h de incubação.	68
Tabela 16 – Viabilidade celular pelo método de MTT nas linhagens celulares SiHa, HeLa, Caco-2 e B16-F10. Dados expressos em valores de CI ₅₀ (µg/mL), após 24 h de incubação.	69

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AcOEt - Extrato alcoólico fúngico ou solvente acetato de etila

AhR - Receptor de hidrocarboneto de arila

AM - α -mangostina

ANOVA - Analysis of Variance (Análise de Variância)

AS49 - Linhagem de células de carcinoma pulmonar humano

ATCC - American Type Culture Collection

B16-F10 - Linhagem de células de melanoma murino

Caco-2 - Linhagem de células de adenocarcinoma colorretal humano

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CFC - Unidade Formadora de Colônia

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CL - Claridade

CMH - Caldo Mueller-Hinton

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato

DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (teste antioxidante)

EC50 - Concentração efetiva de 50% de atividade

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ESI - Ionização por Electrospray

ET - Equivalente de Trolox

ETGs - Genes que direcionam a progressão do tumor

EUA - Estados Unidos da América

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

GLP-1 - Peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1

GraphPad Prism - Software para análise estatística

HCOOH - Ácido fórmico

HCT-116 - Linhagem de células de carcinoma colorretal humano

HEp2 - Linhagem de células de carcinoma de laringe humano

HeLa - Linhagem de células de câncer cervical humano

HepG2 - Linhagem de células de carcinoma hepatocelular humano
hrHPV - Vírus do papiloma humano de alto risco
IC50 - Concentração necessária para inibir 50% da atividade
IFMA - Instituto Federal do Maranhão
ITS - Espaçador interno transcrito
KB - Linhagem de células de carcinoma epidermóide oral humano
LN - Linfonodos
LSD1 - Lisina Demetilase 1
ME - Zona de microemulsão
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
MR - Microemulsão incorporada
MRFA - Met-Arg-Phe-Ala Acetate Salt
MTT - Ensaio de proliferação celular com brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NIC - Neoplasia intraepitelial cervical
NIBA - Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada
NF-κB - Fator nuclear kappa B
NH₄OH - Hidróxido de amônio
PA - Grau analítico (Puro para Análise)
PCA - Ágar padrão de contagem
PC-3 - Linhagem de células de câncer de próstata humano
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PD-L1 - Ligante de Morte Programada 1
PDI - Índice de polidispersividade
PCs - Proproteínas convertases
PN - *Penicillium citrinum*
RBL1 - Proteína de retinoblastoma 1
RBL2 - Proteína de retinoblastoma 2
RB1 - Gene retinoblastoma
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RPMI - Meio Roswell Park Memorial Institute
RZ - *Rhizopus*
SDA - Ágar Sabouraud-Dextrose
SiHa - Linhagem de células de câncer cervical humano HPV-16 positivo

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SOE - Sem outras especificações

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

SV40 - Vírus vacinal Simian 40 (linhagem celular ovariana normal humana)

Taq DNA - DNA polimerase de *Thermus aquaticus*

TP53 - Gene que codifica a proteína tumoral p53

TSGs - Genes supressores de tumor

U937 - Linhagem de células de leucemia monocítica humana

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

Vero - Linhagem de células de rim de macaco-verde africano

Lista de Símbolos

% - Porcentagem

°C - Grau Celsius

= - Igual a

> - Maior que

≤ - Menor ou igual a

B - Beta

cm - Centímetro

g - Grama

g-l - Grama por unidade de volume ou peso

h - Hora

m/zexp - Razão massa/carga experimental

mM - Milimolar

mm - Milímetro

mV - Milivolt

μg - Micrograma

μl - Microlitro

μM - Micromolar

μS - Microsiemens

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

pb - Pares de base

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	15
2- OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2- Objetivos específicos	17
3- REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Fungos, interação e metabolismo	18
3.2. Fungos e aplicações terapêuticas	21
3.3. Câncer	24
3.4 Câncer de colo do útero	26
3.4.1 Epidemiologia	27
3.4.2 Tipos histopatológicos do câncer de colo útero	29
3.4.3 Infecção com vírus HPV de alto risco e carcinogênese	30
3.4.4 Estadiamento	32
3.4.5 Tratamento	34
3.5 Bioprodutos no tratamento do câncer de colo útero	36
3.6 <i>Rhizopus</i> sp	38
3.6.1 <i>Rhizopus microsporus</i>	39
3.6.2 <i>Rhizopus arrhizus</i>	40
4 - MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Obtenção e identificação do fungo <i>Rhizopus</i> sp	41
4.2. Identificação molecular por PCR	41
4.2.1. Cultura e Isolamento fúngico	41
4.2.2 Extração de DNA	42
4.2.3 Primers e Reação em cadeia da Polimerase –PCR	42
4.2.4 Preparo dos Extratos de <i>Rhizopus</i> sp	43
4.3 Análise Química do Extrato de Fungo por Orbitrap-MS	44
4.4 Preparo da Microemulsão	45
4.4.1 Construção do Diagrama de Fases Pseudoternário	45
4.4.2 Preparo da Microemulsão carregada com Extrato de Fungo	46
4.4.3. Caracterização da Microemulsão	46
4.4.3.1 Tamanho hidrodinâmico das micropartículas e índice de polidispersividade (PDI)	46
4.4.3.2 Determinação do tamanho das partículas e potencial zeta	46

4.4.4. Controle da qualidade das microemulsões desenvolvidas	47
4.5 Determinação quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato da microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp	47
4.6 Atividade biológica in vitro do extrato da microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp	48
4.6.1 Atividade Antimicrobiana	48
4.6.1.1- Estirpes bacterianas e condições de cultura	48
4.6.1.2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) pelo método de microdiluição em microplacas	48
4.6.1.3 – Estirpes de Leveduras e condições de cultura	49
4.6.1.4 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) pelo método de microdiluição em microplacas	49
4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS e DPPH	50
4.6.3 Atividade Antitumoral	51
4.6.3.1. Cultivo Celular	51
4.6.3.2 Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT	51
4.7 Aspectos éticos	52
4.8 Análise estatística	52
5- RESULTADOS	53
5.1 Identificação macro e microscópica de <i>Rhizopus</i> sp	53
5.2 Identificação molecular por PCR	54
5.3 Análise Química do Extrato de Fungo por Espectrometria de Massa Orbitrap (Orbitrap-MS)	54
5.4 Diagramas de fases Pseudoternárias	57
5.5 Caracterização da Formulação de microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp	58
5.6 Controle da qualidade das microemulsões desenvolvidas	59
5.7 Quantificação Química de Fenóis e Flavonoides totais de extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp	60
5.8 Atividades Biológicas do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de <i>Rhizopus</i> sp	62
5.8.1 Atividade Antimicrobiana	62
5.8.2 Atividade Antioxidante pela técnica DPPH e ABTS	65
5.8.3 Atividade antitumoral	68
6- DISCUSSÃO	70
7-CONCLUSÃO	77
8-CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO A	
ANEXO B	
ANEXO C	
ANEXO D	

1. INTRODUÇÃO

Os fungos produzem um grande número de produtos naturais com diversas estruturas químicas e atividades biológicas, como o antibiótico penicilina (Campos et al., 2020), a lovastatina que é um hipolipemiante que reduz os níveis de colesterol (Xiong et al., 2019), a ciclosporina A que é imunossupressor (Wu; Kuca, 2018) e os tóxicos carcinógenos aflatoxinas (Caceres et al., 2020; Khan et al., 2021).

Estruturalmente, os produtos naturais fúngicos incluem principalmente policetídeos, peptídeos não ribossômicos, terpenóides, alcalóides (Quin; Flynn; Schmidt-Dannert, 2014) e seus híbridos (Reverberi et al., 2010). Devido às suas atividades biológicas bifaciais (por exemplo, drogas benéficas e toxinas prejudiciais) e estruturas químicas intrigantes, os produtos naturais produzidos por fungos têm atraído atenção significativa de biólogos, químicos e biotecnólogos (Prescott et al., 2023).

Os metabólitos fúngicos são dignamente considerados como um conjunto de novos compostos líderes sinteticamente interessantes e notavelmente importantes para a indústria médica, agrícola e química. As espécies de *Humicola* por exemplo, atraem atenção substancial pela sua marcada capacidade de produzir enzimas termoestáveis com mais de 50 compostos (Ibrahim et al., 2021).

A descoberta de produtos naturais a partir de microrganismos forneceu fontes importantes de antibióticos, agentes anticancerígenos, imunomoduladores, agentes anti-helmínticos e inseticidas durante um período de 50 anos, começando na década de 1940, depois tornou-se menos produtivo devido a problemas de baixo rendimento e falta de novas tecnologias relevantes para revelar produtos naturais semelhantes a medicamentos menos abundantes ou de difícil detecção. No início dos anos 2000 foi observado a partir do sequenciamento do genoma, que as espécies fúngicas codificam cerca de dez vezes mais metabólitos secundários do que o previsto a partir de metabolomas secundários conhecidos (Baltz, 2019).

Os fungos constituem um grupo muito grande de microrganismos que sintetizam metabólitos secundários com diferentes propriedades antimicrobianas (Kuo et al, 2021; Mosquera; Criado; Guerra, 2020), antioxidante (Marsola et al, 2022; Yamashita et al, 2023) e anticancerígenas (Teles et al, 2020; Rybcznska-tkaczyk et al., 2023). Alguns fungos endofíticos produzem imunoestimulantes utilizando compostos obtidos de plantas (Woods et al., 2017).

Dentre os fungos com atividades biológicas comprovadas na literatura a espécie de *Rhizopus* provaram ser úteis em atividades bioindustriais para sintetizar metabólitos. *Rhizopus* é um gênero de fungos zigomicetos saprotróficos (Mucoromycotina, Mucoromycota) que é

onipresente no solo, excrementos de animais e vegetação em decomposição. A filogenia indica que o gênero *Rhizopus* consiste em três classes principais, com *R. microsporus* como a espécie basal, e a linhagem irmã de *R. stolonifer*, e duas espécies intimamente relacionadas *R. arrizus* e *R. delemar*.

Rhizopus oryzae participa da biotransformação da dihidrocapsaicina, juntamente com outros 4 fungos intestinais, resultando em metabólitos inibidores de LSD1 para uso potencial como terapêutico em doenças cancerígenas (glioblastoma) (He et al., 2022).

Extratos de *Rhizopus* são usadas para produzir uma variedade de compostos químicos como ácidos láctico, fumárico, málico e outros ácidos orgânicos, bem como na síntese de etanol, carotenóides e algumas enzimas hidrolíticas (Abe et al., 2003). Diante de uma variedade de compostos químicos presentes no extrato utilizá-lo em uma aplicação terapêutica seria ineficiente pela sua difícil solubilidade e sua reduzida capacidade de liberação, neste sentido para Zainuddin et al, (2021) desenvolver uma microemulsão que proporcione liberação sustentada, controlada e que garanta estabilidade térmica seria o ideal.

As microemulsões melhoram a biodisponibilidade e a estabilidade de um princípio ativo e são preparados com reagentes relativamente simples, usadas exclusivamente para a administração de medicamentos (Callender et al, 2017).

A grande aplicabilidade de metabólitos fúngicos na indústria farmacêutica como agentes antioxidantes, antimicrobianos e antitumorais implica na necessidade de mais estudos que apontem para novas alternativas de tratamento do câncer de colo útero e outras opções de antimicrobianos em vigência da crescente resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis na atualidade. A microemulsão já se mostrou uma eficiente forma de apresentação farmacológica na disponibilização de diferentes drogas, e incorporar o extrato de fungo a microemulsão tem potencial aplicação na indústria farmacêutica como agentes antioxidantes, antimicrobianos e antitumorais, implicando na necessidade de mais estudos que apontem para novas alternativas de tratamento do câncer e outras opções de antimicrobianos.

Nesse contexto, a pesquisa foi realizada para avaliar atividade antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena do extrato de *Rhizopus sp* e microemulsão incorporada com extrato de fungo seria uma formulação eficiente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade biológica de metabólitos secundários obtidos do extrato de *Rhizopus sp.*

2.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato a partir da fermentação do fungo *Rhizopus sp.*;
- Realizar a identificação química dos metabólitos fúngicos presentes no extrato de *Rhizopus sp.*;
- Preparar microemulsão a partir do extrato de *Rhizopus sp.*;
- Analisar atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*; *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Cândida sp.*
- Determinar a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH;
- Avaliar atividade citotóxica dos metabólitos frente as linhagens tumorais de adenocarcinoma cervical (HeLa e SiHa), células Vero, Caco-2, PC-3 e B16-F10.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fungos Interação e Metabolismo

Os fungos constituem um componente importante e diversificado da maioria dos ecossistemas da Terra. São micro e macroorganismos com alta e variada diversidade funcional, bem como grande variação nos modos de dispersão. O sucesso dos fungos como organismos e a sua influência no ambiente reside na sua capacidade de abranger múltiplas dimensões de tempo, espaço e interações biológicas, que não são rivalizadas por outros grupos de organismos. Sugere-se que as interações fúngicas são uma força motriz ecológica, interligando diferentes níveis de organização biológica e ecológica dos seus hospedeiros, concorrentes e antagonistas com o ambiente e o funcionamento do ecossistema (Bahram; Netherway, 2022).

Em habitats terrestres, embora dependam dos seus hospedeiros para obter recursos de carbono, os fungos mutualistas e patogênicos desempenham papéis fundamentais na condução das propriedades físico-químicas e biológicas do seu ambiente, bem como na dinâmica da população hospedeira (Bagchi et al., 2014; Chen et al., 2019; Clemmensen et al., 2013; Pounds et al., 2006; Tedersoo; Bahram; Zobel, 2020). Entretanto, os fungos saprotróficos são os principais agentes de decomposição da matéria orgânica, desempenhando um papel central na ciclagem de carbono e nutrientes em muitos ecossistemas (Averill; Turner; Finzi, 2014; Fernandez; Kennedy, 2016; Netherway et al., 2021). Em habitats aquáticos, os fungos podem regular a dinâmica da rede alimentar e o ciclo biogeoquímico, tornando os recursos mais disponíveis para consumidores de ordem superior e aumentando a eficiência da transferência trófica através dos ecossistemas aquáticos (Grossart et al., 2019).

Os fungos preenchem a divisão entre micro e macroorganismos, desde leveduras unicelulares até macrofungos complexos que produzem estruturas que rivalizam com plantas e animais em termos de tamanho. As características dos fungos e sua ecologia, incluindo suas associações com outros organismos, pode ter permitido que os fungos se tornassem agentes centrais dos processos ecossistêmicos, ecológicos e evolutivos (Bahram; Netherway, 2022).

O secretoma (conjunto total de moléculas secretadas pelas células) bem desenvolvido e diversificado dos fungos, contribui para sua versatilidade metabólica, estabelecendo interações saprotróficas, mútuas e patogênicas (Bouws; Wattenberg; Zorn, 2008; Choi et al., 2010; Girard et al., 2013). Os secretomas fúngicos se sobrepõem muito entre estilos de vida mutualísticos, saprotróficos e patogênicos (Hess et al., 2018; Plett; Martin, 2015), facilitando assim potencialmente as transições de estilo de vida para evoluir e se adaptar às diversas condições ambientais (Girard et al., 2013).

Esses secretomas permitem que os fungos extraiam nutrientes de substratos diferentes e complexos, mas também protegem os fungos de condições ambientais hostis (Girard et al., 2013). Fungos simbióticos e de vida livre podem habitar áreas extremas, mas vastas, de terras áridas e desempenhar um papel importante no intemperismo das rochas e, portanto, na formação do solo e criar microhabitats para outros grupos de organismos (Coleine et al., 2021). Combinado com seu hábito de formação de hifas, talvez como suas características principais, o arsenal enzimático de fungos facilitou seu domínio na habitação e decomposição de substratos derivados de plantas.

A alta diversidade de enzimas ativas de carboidratos de fungos patogênicos e saprotróficos lhes dá flexibilidade para se adaptarem a diferentes espécies de plantas e seus recursos, e a diversificação dos modos nutricionais dos fungos está evolutivamente ligada à diversificação de angiospermas e gimnospermas (Janusz et al., 2017). Estudo Lange; Barrett; Meyer (2021) sugere que as espécies de fungos com a maior capacidade e a mais ampla diversidade de substratos enzimáticos têm formas de vida inesperadas, como endófitos septados escuros e leveduras negras endolíticas, enquanto as espécies tradicionalmente exploradas para fins industriais têm uma classificação bastante baixa em termos de tais parâmetros enzimáticos.

Metabólitos primários aqueles necessários para o crescimento, desenvolvimento e reprodução normais, já os metabólitos secundários são moléculas bioativas derivadas de vias metabólicas centrais e pools de metabólitos primários. Assim os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, enquanto os metabólitos secundários, são produtos secundários ou produtos naturais, que aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento do organismo. Os genes que são necessários para a síntese de um metabólito primário estão dispersos por todo o genoma fúngico, já os genes que codificam as atividades enzimáticas para produzir qualquer metabólito secundário são organizados de forma contígua como um cluster de genes biossintéticos (Keller, 2019).

A síntese de metabólitos secundários envolve principalmente a polimerização de metabólitos primários por enzimas dedicadas (frequentemente chamadas de espinha dorsal ou enzimas centrais). Os metabólitos gerados pelas enzimas da espinha dorsal são ainda “decorados” por enzimas adicionais que podem alterar enormemente as bioatividades dos metabólitos. A enzima principal define a classe química do metabólito secundário gerado. Por exemplo, as policetídeos sintases (PKSs) produzem policetídeos a partir de acil-CoAs; os peptídeos sintetases não ribossômicas (NRPSs) geram peptídeos não ribossômicos a partir de aminoácidos; e terpenos sintases e as terpenos ciclases (TSs e TCs, respectivamente) geram terpenos a partir de unidades de isopreno ativadas. Alguns metabólitos secundários são híbridos

sintetizados a partir de duas sintases e/ou sintetases, como a fumagilina (híbrido PKS-TC) ou a equinocandina (híbrido PKS-NRPS).

Os metabólitos secundários híbridos derivados de PKS-NRPS são frequentemente chamados de lipopeptídeos, mas é necessário cuidado ao assumir as origens dos lipopeptídeos, pois o termo também se refere a moléculas formadas a partir de peptídeos derivados de ribossomos ligados a ácidos graxos ou isoprenóides (como feromônios canônicos de reprodução de fungos) (Caldwell; Naider; Becker, 1995). As duas enzimas podem ser separadas (por exemplo, NRPS e PKS, gerando valactamida) (Clevenger et al., 2017) ou fundidas (NRPS–PKS, gerando ácido tenuazônico) (Yun; Motoyama; Osada, 2015).

Estas enzimas de base definem as classes “típicas” de metabólitos secundários, ressaltando a interessante química envolvida na síntese destes metabólitos. Os metabólitos secundários fúngicos que não são gerados pelas sintases ou sintetases incluem o peptídeo derivado do ribossomo ustiloxina (Uemura et al., 2014), oxilipinas derivadas de ácidos graxos e o recentemente identificado isocianeto xantocilina, que requer uma isocianeto sintase (Lim et al., 2018).

A diversidade de metabólitos secundários produzidos por fungos, que são centrais para respostas ofensivas e defensivas (Rohlf; Churchill, 2011), facilitam associações com hospedeiros (Keller, 2019), ao mesmo tempo que interagem (positiva ou negativamente) e influenciam bactérias no estabelecimento de interações com hospedeiros (Bahram et al., 2018; Durán et al., 2018; Pierce et al., 2021). Além disso, os metabólitos secundários dos fungos desempenham um papel na germinação dos esporos, inibindo os esporos de espécies concorrentes ou promovendo os seus próprios (Becker et al., 2012; Khalid et al., 2018). Embora pouco explorados, pelo menos alguns dos principais metabólitos secundários dos fungos - incluindo aflatoxinas, melanina e antibióticos β -lactâmicos - parecem estar altamente compartimentados em vesículas que auxiliam no seu armazenamento e transporte sob diversas condições, como limitação de luz e nitrogênio (Chanda et al., 2009).

Os fungos podem regular a produção de seu metabólito secundário com base nas condições ambientais, em particular luz e temperatura, por meio de regulações transcricionais e epigenéticas (Keller, 2019).

Os fungos têm sido reconhecidos como uma grande fonte de metabólitos bioativos com grande aplicabilidade médica, na agricultura e farmacêutica. Sabe-se que as estruturas inéditas e extratos bioativos produzidos pelos fungos superam a quantidade de substâncias naturais produzidas por qualquer outro micro-organismo de qualquer habitat (Barbosa et al., 2020). Isso pode estar relacionado com a interação simbiótica, estabelecida por indução de vias

biossintéticas específicas que são capazes de produzir metabólitos secundários inéditos, e isso dependendo de fatores bióticos e abióticos (Aprill, 2020).

3.2 Fungos e aplicações terapêuticas

Os microrganismos são fontes abundantes de produtos naturais desenvolvidos com produtos fins comerciais para a medicina humana, saúde animal e proteção de culturas vegetais. Nos primeiros anos da descoberta de produtos naturais a partir de microrganismos (A Idade de Ouro), novos antibióticos foram encontrados com relativa facilidade a partir de métodos de fermentação de baixo rendimento e de triagem de células inteiras. Mais tarde, abordagens de genética molecular e química medicinal foram aplicados para modificar e melhorar as atividades de importantes estruturas químicas e métodos de triagem mais sofisticados foram direcionados aos estados patológicos alvo. Os produtos naturais continuaram a fornecer estruturas fundamentais para o desenvolvimento de medicamentos. No atual milênio, descobriu-se, a partir da sequenciação do genoma, que micróbios com genomas grandes têm a capacidade de produzir cerca de dez vezes mais metabólitos secundários do que se reconhecia anteriormente (Katz; Baltz, 2016).

Os fungos são a fonte de alguns dos medicamentos mais importantes já descobertos, incluindo medicamentos de importância histórica, bem como medicamentos recentes de grande sucesso. Esses compostos encontraram papéis essenciais no tratamento de condições crônicas, predominantemente para infecções crônicas (antibióticos e antifúngicos), doenças autoimunes (imunossupressores) e hipercolesterolemia (as estatinas). Mais recentemente, metabólitos derivados de fungos têm entrado em ensaios clínicos para tratar doenças crônicas como câncer e depressão resistente a medicamentos (Prescott et al., 2023).

Em uma recente revisão de Prescott et al., (2023) foram levantados alguns medicamentos de origem fúngica aprovados, incluindo moléculas isoladas de produtos natural e seus derivados sintéticos, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Medicamentos aprovados de origem fúngica, incluindo a molécula original do produto natural e, quando relevante, os seus derivados sintéticos.

Produto natural	Derivado Sintético	Fonte original Organismo	Uso	Mecanismo de ação
Penicilina G	-	<i>Penicillium rubens</i>	Antibiótico	Inibição da parede celular bacteriana Síntese de peptidoglicano.
Penicilina V	-	<i>Penicillium rubens</i>	Antibiótico	Síntese de peptidoglicano Inibição da parede celular bacteriana.
Cefalosporina C	Cefalosporinas	<i>Acremonio crisógeno</i>	Antibiótico	Inibição da síntese de proteínas bacterianas, previne a translocação de fator de alongamento G.
Ácido fusídico	-	<i>Acremonium fusidioides</i>	Antibiótico	Inibição da síntese de proteínas bacterianas. Liga-se ao ribossomo 50S subunidade e inibe o peptidil centro de transferase.
Pleuromutilina	Retapamulina	<i>Clitophilus scyphoides</i>	Antibiótico	Inibição da síntese de proteínas bacterianas. Liga-se ao ribossomo subunidade 50S e inibe o peptidil centro de transferase.
Fusafungina	-	<i>Fusarium laterício</i>	Antimicrobiano e anti-inflamatório	Inibição da expressão de citocinas de macrófagos alveolares por vários mecanismos.
Griseofulvina	-	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Droga antifúngica	Interfere na polimerização de microtúbulos fúngicos.
Equinocandina B0	Anidulafungina	<i>Aspergillus espinulosproso</i>	Droga antifúngica	Inibe a síntese da parede celular fúngica por inibir a glucano sintase.
FR901379	Micafungina	<i>Coleofoma cilindrospora</i>	Droga antifúngica	Inibe a síntese da parede celular fúngica por inibir a glucano sintase.
Pneumocandina B0	Caspofungina	<i>Glarea lozoyensis</i>	Droga antifúngica	Inibe a síntese da parede celular fúngica por inibir a glucano sintase.
Enfumafungina	Ibrexafungerp	<i>Endoconidioma carpetano</i>	Droga antifúngica	Inibe a síntese da parede celular fúngica por inibir a glucano sintase.
Ácido micofenólico	Micofenolato mofetil	<i>Penicillium brevicompacto</i>	Imunossupressor	Inibição da proliferação de linfócitos (inibição da inosina-5'- da monofosfato desidrogenase).
Mizoribina	-	<i>Penicillium brefeldianum</i>	Imunossupressor	Inibição da proliferação de linfócitos (inibição da inosina-5'- da monofosfato desidrogenase).
Ciclosporina A	-	<i>Tolipocládio inflatum</i>	Imunossupressor	Inibição da proliferação de linfócitos T (liga-se à ciclofilina A, induzindo a inibição da calcineurina).
Miriocina	Fingolimode	<i>Melanocarpio albomyces</i>	Imunossupressor, (esclerose múltipla)	A miriocina inibe o esfingolípido síntese.Fingolimod é uma

Mevastatina	-	<i>Penicillium citrinum</i>	Redução do colesterol	esfingosina 1-fosfato agonista do receptor. Inibe a síntese de colesterol pela inibição da HMG-CoA redutase.
Lovastatina	-	<i>Monascus ruber,</i> <i>Aspergillus terreus</i>	Redução do colesterol	Inibe a síntese de colesterol pela inibição da HMG-CoA redutase.
Ergotamina	Tartarato de ergotamina	<i>Claviceps purpurea</i>	Agente antiemigração	Vasoconstrição cerebral (bloqueador alfa-adrenérgico).
Ergometrina	Maleato de ergometrina e outros compostos	<i>Claviceps purpurea</i>	Manejo da hemorragia pós-parto	Induz a contração uterina por meio de efeitos agonistas no miométrio Receptores 5-HT ₂ .
Ergocriptina	Bromocriptina	<i>Claviceps purpurea</i>	Hiperprolactinemia e condições obstétricas	Agonista da dopamina bloqueia a liberação de prolactina pela glândula pituitária.
Lentinan	-	<i>Lentinus edodes</i>	Adjuvante para câncer quimioterapia	Imunomodulador, liga-se e ativa vários extracelulares receptores em monócitos e neutrófilos.

-: não sintetizado nesta pesquisa. Fonte Prescott et al., (2023).

Os actinomicetos mais talentosos têm a capacidade de produzir cerca de 30 a 50 metabólitos secundários. Com a queda vertiginosa no custo do sequenciamento do genoma, se tornou viável sequenciar milhares de genomas de actinomicetos para identificar a “matéria escura biossintética” como fontes para a descoberta de novos e inovadores metabólitos secundários. Avanços em bioinformática, espectrometria de massa, proteômica, transcriptômica, metabolômica e expressão gênica estão impulsionando o novo campo de mineração do genoma microbiano para aplicações na descoberta e desenvolvimento de produtos naturais (Katz; Baltz, 2016).

Os primeiros exemplos de isolamento composto datam de pelo menos 1893. Apesar deste conhecimento precoce da bioatividade fúngica, a história da descoberta de medicamentos fúngicos começa, em muitos aspectos, com a descoberta da penicilina na década de 1940. A penicilina é um antibiótico beta-lactâmico que inibe a ligação cruzada de peptidoglicanos, que são um componente estrutural das paredes celulares bacterianas (Lederberg, 1957). A cefalosporina C (organismo produtor *Acremonium crisogenum*, isolado em 1945), compartilha a mesma estrutura betalactâmica das penicilinas e também apresenta um mecanismo de ação semelhante (Bo, 2000).

Paradoxalmente, os fungos também têm sido uma importante fonte de medicamentos antifúngicos. Um dos primeiros exemplos de um composto antifúngico derivado de um fungo

é a griseofulvina, relatada pela primeira vez em 1938 em *Penicillium griseofulvum* (Oxford; Raistrick; Simonart, 1939). A griseofulvina é usada no tratamento de infecções dermatófitas da pele, unhas e cabelos, e acredita-se que exerça sua atividade antifúngica interferindo na função dos microtúbulos do fuso mitótico (Jumiati; Chandra; Asra, 2021). Um exemplo mais recente de medicamentos antifúngicos derivados de fungos são as equinocandinas, que são potentes inibidores lipopeptídicos da 1,3- β D-glucano sintase, uma enzima necessária para a biossíntese da parede celular em fungos. Os derivados semissintéticos caspofungina, micafungina e anidulafungina são antimicóticos de primeira linha utilizados no tratamento de micose invasiva (Hüttel, 2021).

Os fungos também têm sido uma fonte altamente bem-sucedida de compostos imunossupressores. O primeiro medicamento imunossupressor a ser descoberto foi o ácido micofenólico em 1893, embora seu uso clínico seja muito mais recente. O ácido micofenólico foi isolado pela primeira vez de *Penicillium brevicompactum* que é encontrado na silagem de milho estragado (Freedman et al., 2020). O ácido micofenólico inibe a inosina monofosfato desidrogenase, bloqueando assim a biossíntese de guanina, que por sua vez bloqueia a proliferação de linfócitos. É usado como imunossupressor para cirurgia de transplante de órgãos (Freedman et al., 2020); um derivado sintético do micofenolato mofetil foi aprovado em 1995 para uso durante o transplante renal (Demain; Martens, 2017).

Uma pesquisa bibliográfica que abrangeu o período entre 1993 e 2001, mostrou que dos 1.500 compostos isolados de fungos, mais da metade apresentava atividade antibacteriana, antifúngica ou antitumoral (An, 2004). Mais tarde, nova revisão entre 2009 e 2013, cobrindo produtos naturais fúngicos descobertos neste período, confirmou o enorme potencial do metaboloma secundário fúngico (Schueffler; Anke, 2014).

3.3 Câncer

Os cânceres têm afetado seres vivos multicelulares há mais de 200 milhões de anos, e há evidências desta patologia entre os antepassados dos humanos modernos que remontam a mais de um milhão de anos (Hausman, 2019). A mortalidade por câncer diminuiu nas três últimas décadas na maioria dos países de renda elevada, refletindo melhorias na prevenção, diagnóstico e manejo do câncer. No entanto, existem diferenças persistentes e substanciais na mortalidade, incidência e sobrevivência em todo o mundo (Santucci et al., 2020).

O câncer é uma divisão celular descontrolada e geralmente identificada numa fase tardia da sua progressão. Origina-se de uma única célula e se espalha por todo o corpo. As células

saudáveis mudam gradualmente para um estado neoplásico, e são necessárias múltiplas etapas de desenvolvimento das células cancerígenas para se tornarem tumorigênicas e eventualmente malignas (Hausman, 2019). São descritas oito características que possibilitam a atividade cancerígena: capacidades adquiridas para sustentar a sinalização proliferativa, evitar supressores de crescimento, resistir à morte celular, permitir a imortalidade replicativa, induzir/acessar a vasculatura, ativar invasão e metástase, reprogramar o metabolismo celular e evitar a destruição imunológica (Hanahan, 2011).

Os cânceres representam ecossistemas complexos que compreendem células tumorais e uma infinidade de células não cancerosas, incorporadas em uma matriz extracelular alterada. O microambiente tumoral inclui diversos tipos de células imunes, fibroblastos associados ao câncer, células endoteliais, pericitos e vários tipos adicionais de células residentes dos tecidos. Estas células hospedeiras já foram consideradas espectadoras da tumorigênese, mas agora são conhecidas por desempenharem papéis críticos na patogênese do câncer. A composição celular e o estado funcional do microambiente tumoral podem diferir extensivamente dependendo do órgão em que o tumor surge, das características intrínsecas das células cancerígenas, do estágio do tumor e das características do paciente (De Visser; Joyce, 2023).

Muitos cânceres ocorrem em locais de inflamação devido a irritação e/ou infecção crônica. O microambiente tumoral contém várias células inflamatórias e diferentes mediadores que orquestram diversos processos neoplásicos, incluindo proliferação, sobrevivência, adesão e migração. Paralelamente, as células tumorais adaptaram algumas das moléculas de sinalização utilizadas pelas células inflamatórias, tais como selectinas e quimiocinas, bem como os seus receptores para invasão, extravasamento e subsequentemente metástase. A expressão e/ou ativação da maioria destas moléculas é mediada pelas proproteínas convertases (PCs); proteases expressas por células tumorais e células inflamatórias (Siegfried et al., 2020).

A aberrância na progressão do ciclo celular é um dos mecanismos fundamentais subjacentes à tumorigênese, tornando os reguladores da maquinaria do ciclo celular como alvos terapêuticos anticancerígenos racionais. Um crescente conjunto de evidências indica que a via reguladora do ciclo celular se integra a outras características do câncer, incluindo a remodelação do metabolismo e o escape imunológico. Assim, as terapias contra os componentes da maquinaria do ciclo celular podem não só reprimir a divisão das células cancerígenas, mas também reverter o metabolismo do câncer e restaurar sua vigilância imunitária. Além dos efeitos contínuos no desenvolvimento de inibidores de pequenas moléculas da maquinaria do ciclo celular, quimeras direcionadas à proteólise foram recentemente utilizadas para atingir essas proteínas oncogênicas relacionadas à progressão do ciclo celular (Liu; Peng; Wei, 2022).

3.4 Câncer de colo útero

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, foram registrados 19,3 milhões de novos casos e 10,0 milhões de mortes relacionadas com o câncer (FERLAY et al., 2021; SUNG et al., 2021). Prevê-se que a taxa de câncer aumente com o envelhecimento da maioria das populações devido à diminuição das taxas de fertilidade e ao aumento da expectativa de vida. Os avanços nos tratamentos sistêmicos, de radiação e cirúrgicos trouxeram ganhos substanciais na sobrevivência a longo prazo ou mesmo na cura de muitos tipos de câncer. Além disso, nas últimas décadas, o rastreamento e a detecção precoce provou ser uma estratégia eficaz de prevenção de cânceres, como os do colo do útero, cólon, mama e pulmão; no entanto, o rastreamento permanece não comprovado ou controverso para a maioria dos cânceres (De La Salud, 2023). O esfregaço cervicovaginal e colpocitologia oncótica cervical, também chamado de “Papanicolaou” em homenagem ao patologista grego Georges Papanicolaou, que criou o método no início do século, é o exame de rastreamento mais utilizado para identificação de alterações neoplásicas e pré-neoplásicas relacionadas ao câncer de colo útero (Papanicolaou; Traut, 1941).

O ano de 2020 registrou cerca de 604.000 novos casos de câncer de colo do útero e 324.000 mortes em todo o mundo, com quase 90% destes casos ocorrendo em países de baixa e média renda (Choi et al., 2023).

O câncer do colo do útero é causado predominantemente por infecções persistentes pelo vírus do papiloma humano (HPV). Dos 200 tipos de HPV identificados, 12 foram designados como cancerígenos pela Agência Internacional de Investigação do Câncer, sendo o HPV-16 responsável por 50% e o HPV-18 por 10% dos casos de câncer do colo do útero. A infecção viral persistente com genótipos de HPV de alto risco é o agente causador e pode ser detectada em 99,7% de pacientes com câncer cervical em todo o mundo. A infecção por HPV é transmitida sexualmente e cerca de 80% das mulheres serão infectadas em algum momento de sua vida (Johnson et al., 2019; Wall et al., 2023).

A infecção por uma destas duas estirpes de HPV é responsável por um aumento de 435 e 248 vezes no risco de câncer, respectivamente, em comparação com um indivíduo não infectado (Yuan et al., 2021). A infecção viral persistente com genótipos de HPV de alto risco é o agente causador e pode ser detectada em 99,7% dos pacientes com câncer cervical em todo o mundo (Walboomers et al., 1999).

A infecção pelo HPV é transmitida sexualmente e cerca de 80% das mulheres serão infectadas em algum momento da vida, muitas delas aos 45 anos (Chesson et al., 2014). A infecção por HPV é frequentemente contraída durante a adolescência e início da idade adulta,

(Lopez et al., 2017) e como a infecção é assintomática pode levar de 10 a 15 anos para manifestar alterações no colo do útero (Chelimo et al., 2013).

Apesar do advento das vacinas, das recomendações de prevenção e rastreio, o câncer de colo útero ainda figura como o quarto tipo mais comum entre as mulheres no mundo, com mais de meio milhão de novos casos por ano e responsável por 311 mil mortes. No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais frequente e a quarta causa de óbito por câncer entre as mulheres – principalmente as negras, pobres e com baixos níveis de educação formal (OPAS, 2023).

3.4.1 Epidemiologia

Atualmente, a capacidade dos países para atingir as metas da estratégia global da OMS para acelerar a eliminação do câncer de colo do útero é limitada pela sua condição socioeconômica. Para aumentar a eficácia das medidas de prevenção primária, investigadores de diferentes países propõem: aumentar a conscientização sobre os riscos do HPV e o papel do vírus na oncogênese, não só entre as mulheres, mas também entre os homens; inclusão da vacinação contra o HPV dos rapazes nos calendários nacionais de imunização; desenvolvimento de novas vacinas contra o HPV (Kakotkin et al., 2023).

O câncer cervical é altamente evitável e pode ser facilmente tratado se detectado em estágios iniciais. No entanto, existe um impacto desproporcionalmente elevado de incidência e mortalidade por câncer do colo do útero em países de baixo e médio rendimento que não dispõem de programas organizados de rastreio e prevenção. Apesar das sólidas evidências atuais para a prevenção e rastreio do câncer do colo do útero, existem barreiras à adoção e implementação de medidas específicas de cada país.

Estes colocam desafios únicos, como a organização da prestação de serviços de prevenção e rastreio através da infra-estrutura de saúde atual, o acesso a instalações de rastreio, a gestão do acompanhamento e ligações adequadas para diagnóstico confirmatório e subsequente tratamento. As taxas globais de rastreio do câncer do colo do útero e o rastreio do câncer entre as mulheres ainda permanecem abaixo do ideal em muitos países de baixa e média renda.

São necessárias estratégias e ferramentas custo-efetivas para reduzir o impacto do câncer de colo do útero em todo o mundo, a fim de mitigar as disparidades existentes nos índices de câncer de colo do útero entre locais com poucos e muitos recursos. As diretrizes atuais de prevenção e rastreio baseiam-se nas evidências mais robustas geradas a partir de ensaios aleatórios e estudos transversais realizados no contexto socioeconômico, cultural e de sistemas de saúde de ambientes geográficos variados e, portanto, estão em conformidade com a

aplicabilidade em larga escala, sustentável e implementação uniforme de programas de rastreio e prevenção do câncer do colo do útero baseados na população (Pimple; Mishra, 2019).

Para aumentar a eficácia das medidas de prevenção secundária (rastreio precoce de lesões cervicais pré-cancerosas), propõe-se: Um estudo mais intenso sobre a eficácia da análise de amostras auto-coletadas; pesquisa de marcadores moleculares de carcinogênese em amostras auto-coletadas; utilização de inteligência artificial para detectar anomalias em amostras para testes de papanicolau; utilização de inteligência artificial em biópsias cervicais guiadas para melhorar a precisão da histologia; desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas para tratamentos baseados na análise do microbioma vaginal (Kakotkin et al., 2023).

O câncer cervical é a terceira principal doença maligna entre as mulheres, depois dos cânceres de mama e colorretal em todo o mundo, com 569.000 novos casos a cada ano (Cancer, 2018; Li Yanyunand Xu, 2017). A infecção por HPV está associada à maioria dos casos de câncer do colo do útero, sendo os HPV 16 e 18 identificados como os subtipos mais cancerígenos, representando mais de 50% e 10% dos casos, respectivamente (De Martel et al., 2017).

Subtipos adicionais foram identificados, embora com menor frequência, em casos de câncer cervical. Estes incluem HPV 31, 33 e 45, cada um associado a aproximadamente 5% dos casos, HPV 52 com 3%, e HPV 35 e- 58 cada com 2% (Li Yanyunand Xu, 2017; Wall et al., 2023). É importante notar que, embora raros, foram identificados casos negativos para HPV; em um estudo, esses casos foram associados a adenocarcinomas, apresentação em estágio avançado e pior sobrevida livre de doença quando comparados com casos positivos para HPV (Rodríguez-Carunchio et al., 2015).

Os fatores de risco do câncer cervical incluem contribuintes comportamentais e infecciosos. Contribuintes comportamentais incluem atividade sexual e fatores de estilo de vida. A idade da primeira relação sexual aumenta o risco de câncer cervical (Ribeiro et al., 2015), com o primeiro encontro sexual em uma idade mais jovem ou a proximidade da menarca aumentando o risco (Ruiz et al., 2012).

A relação sexual antes dos 18 anos contribui a um aumento de duas vezes no risco de desenvolver cancro do colo do útero quando comparado com a idade da primeira relação sexual superior a 21 anos de idade. Em comparação com um parceiro, o risco duplica aproximadamente com dois parceiros e triplica com seis ou mais parceiros (Kumbhaj; Sharma; Bhatnagar, 2013).

A paridade é um fator de risco. Idade inferior a 18 anos na gravidez a termo e gestações múltiplas (4 partos vaginais) foram associadas como fatores de risco para infecção por HPV

e/ou câncer cervical. Fumar contribui para o risco de câncer cervical. As doenças sexualmente transmissíveis como clamídia e herpes genital estão associadas ao risco aumentado de infecção por HPV. A coinfeção com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode debilitar o sistema imunológico na contenção da infecção pelo HPV 16. O uso prolongado de contraceptivos orais por mais de 5 anos aumenta o risco de câncer cervical. O risco aumenta 1,9 vezes a cada 5 anos de uso de contraceptivos orais. Mulheres tratadas para neoplasia intraepitelial cervical têm um risco 2 a 3 vezes maior de desenvolver câncer cervical no futuro (Choi et al., 2023; Vesco et al., 2011).

3.4.2 Tipos histopatológicos do câncer de colo útero

É fundamental que todos os cânceres sejam confirmados por exame de microscopia. São classificados como carcinomas do colo do útero se o crescimento primário ocorrer no colo do útero (Bhatla et al., 2021a). Todos os tipos histológicos devem ser incluídos. Os tipos histopatológicos, conforme descrito na Classificação da OMS dos Tumores Genitais Femininos são os seguintes (Höhn et al., 2021) (Tabela 2).

Tabela 2: Tipos histopatológicos do câncer de colo útero

Tumores epiteliais escamosos	Tumores glandulares
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células escamosas, associado ao HPV • Carcinoma de células escamosas, independente de HPV • Carcinoma espinocelular SOE 	<ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma SOE • Adenocarcinoma associado ao HPV • Adenocarcinoma, tipo gástrico independente de HPV • Adenocarcinoma, tipo de células claras, independente de HPV • Adenocarcinoma, tipo mesonéfrico independente de HPV • Adenocarcinoma, independente de HPV, SOE • Adenocarcinoma endometriode SOE • Carcinossarcoma SOE • Carcinoma adenoescamoso • Carcinoma mucoepidermóide • Carcinoma adenoide basal • Carcinoma indiferenciado, SOE
<p>Tumores epiteliais e mesenquimais mistos</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Adenossarcoma • Tumores de células germinativas • Tumor do seio endodérmico • Tumor do saco vitelino SOE • Coriocarcinoma SOE 	

* SOE (sem outras especificações)

Adaptado de Höhn et al., 2021.

3.4.3 Infecção com vírus HPV de alto risco e carcinogênese

Os HPVs pertencem à família Papillomaviridae, que são vírus pequenos, sem envelope e de fita dupla de DNA, e os responsáveis virais mais comuns de infecções do trato reprodutivo (Graham, 2010; Jendoubi-Ferchichi et al., 2018; World Health Organization, 2022). O genoma do HPV é circular e estimado em oito pares de quilobases, com a maioria codificando oito proteínas que podem ser divididas em regiões “iniciais” ou “tardias” (Jendoubi-Ferchichi et al., 2018). A região “inicial” contém seis proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que são responsáveis pela replicação do genoma do HPV e pela modulação imunológica (Jendoubi-Ferchichi et al., 2018).

A região “tardia” consiste nas proteínas do capsídeo L1 e L2, que foram relatadas como desempenhando um papel na transmissão do vírus (Graham, 2010). Nem todos os tipos de HPV têm potencial oncogênico, com mais de 200 subtipos de HPV identificáveis como de baixo ou alto risco com base no seu grau de oncogenicidade (Graham, 2010; Jendoubi-Ferchichi et al., 2018; Williams et al., 2011), HPVs de baixo risco, como HPV 6, 11, 42, 43 e 44, são classificados como tal devido a geralmente causarem apenas lesões epiteliais benignas, como verrugas e papilomas (Jendoubi-Ferchichi et al., 2018, Williams et al., 2011).

Por outro lado, os HPVs de alto risco (hrHPV), incluindo os HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70, são fortemente ligadas ao desenvolvimento de câncer cervical, anal, peniano, vulvar, vaginal e orofaríngeo (Jendoubi-Ferchichi et al., 2018; Williams et al., 2011). Aproximadamente 40 HPVs estão especificamente relacionados à região anogenital, sendo os HPV 16 e 18 considerados os hrHPVs mais potentes, responsáveis por quase metade das pré-malignidades cervicais de alto grau (World Health Organization, 2022).

Especificamente no Reino Unido, um estudo de 2014 relatou que os tipos 16 e 18 do hrHPV eram altamente prevalentes (83%) em mulheres com menos de 30 anos, enquanto outros tipos de hrHPV (31, 33, 45, 52 e 58) foram detectados em 16,1 % de cânceres cervicais positivos para hrHPV, independentemente da idade (Mesher et al., 2015).

O HPV é transmitido principalmente através do contato direto pele a pele ou pele com mucosa (Manini; Montomoli, 2018). A atividade sexual (incluindo relação sexual vaginal, anal ou oral) com um indivíduo que tem infecção ativa por HPV é o modo de transmissão mais comum (Sabeena et al., 2017). Além disso, há transmissão horizontal não sexual do HPV através do contato com a pele, boca ou fômite, que são menos comuns (Petca et al., 2020, Manini; Montomoli, 2018). Em relação ao câncer do colo do útero, alguns fatores de risco estão associados à sua natureza sexualmente transmissível, como relações sexuais desde tenra idade

e ter múltiplos parceiros sexuais (Liu et al., 2015; Louie et al., 2009). A infecção por HPV é altamente prevalente, com um estudo estimando que as mulheres nos Estados Unidos (EUA), que têm intervenções semelhantes às do Reino Unido, apresentam um risco de infecção ao longo da vida entre 53,6% e 95%, tornando assim uma prioridade reduzir o peso desta doença (Chesson et al., 2014).

Noventa por cento das alterações celulares induzidas pelo HPV no colo do útero regridem espontaneamente e o HPV é eliminado do corpo, sem quaisquer consequências oncogênicas (Williams et al., 2011). No entanto, quando uma infecção por hrHPV escapa ao sistema imunológico, o que é particularmente comum entre pacientes imunocomprometidos, pode ocorrer discariose e neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Dugué et al., 2015). A NIC é uma coleção anormal pré-maligna de células que, se não tratada, pode progredir para se tornar um carcinoma invasivo (Balasubramaniam et al., 2019).

A fisiopatologia não é totalmente compreendida, mas acredita-se que microabrasões na superfície epitelial sejam a rota mais provável para os HPVs infectarem a camada basal epitelial (Graham, 2010; Song et al., 2015). Após a interação do DNA viral do HPV com a célula hospedeira, o vírus é então internalizado e transportado para o núcleo para posterior replicação (Horvath et al., 2010; Richards et al., 2006). E6 e E7 são proteínas que possuem forte potencial oncogênico ao interagir com genes supressores de tumor (TSGs), a proteína tumoral p53 (TP53) e proteínas de retinoblastoma (pRb), respectivamente (Crosbie et al., 2013; Shimada et al., 2020).

E6 tem como alvo o TP53 para degradação através da via da ubiquitina, prevenindo assim a apoptose (Crosbie et al., 2013; Shimada et al., 2020). E7 tem como alvo os membros da família do retinoblastoma RB1, RBL1 e RBL2, que, conseqüentemente, impulsionam o processo oncogênico (Crosbie et al., 2013; White; Münger; Howley, 2016). O HPV depende do sistema de replicação da célula humana, pois não possui o seu próprio.

Conseqüentemente, as células dormentes intrinsecamente diferenciadas devem ser induzidas a replicar novamente, o que os vírus conseguem com a atividade E6 e E7. Além disso, o E5 é considerado um cofator fraco que pode acelerar a expressão do oncogene, embora quaisquer efeitos significativos sobre E6 e E7 ainda não tenham sido comprovados (Venuti et al., 2011). Portanto, a regulação negativa destes ETGs causa instabilidade genômica, conduzindo assim a transformação maligna de uma célula infectada por HPV em uma célula cancerígena invasiva. As células epiteliais basais têm ciclos de replicação intimamente relacionados ao HPV, em que a expressão gênica precoce resulta em amplificação substancial do DNA viral (Graham, 2017).

Na zona média epitelial e nas zonas superficiais, ocorre maior replicação viral do genoma e expressão dos genes L1, L2 e E4 (Crosbie et al., 2013; Graham, 2010). L1 e L2 encerram os genomas virais para formar vírions descendentes no núcleo, que então formam novas infecções (Crosbie et al., 2013; Fay; Panté, 2015). Devido à natureza não envelopada do vírus, o capsídeo possui uma estrutura de membrana não lipídica, na qual L1 desempenha um papel vital na sua formação (Kirnbauer et al., 1992; Wang; Roden, 2013).

3.4.4 Estadiamento

O câncer de colo do útero é estadiado segundo classificação sugerida pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Bhatla et al., 2019; Corrigendum, 2019) (Tabela 3).

Tabela 3: Estadiamento do câncer de colo do útero

Estádio	Descrição
I	Carcinoma estritamente confinado ao colo (a extensão para o corpo uterino não é considerada).
IA	Carcinoma invasor diagnosticado somente pela microscopia, com profundidade de invasão máxima ≤ 5 mm ^a
	IA1 Invasão do estroma $\leq 3,0$ mm de profundidade
	IA2 Invasão do estroma $> 3,0$ mm e $\leq 5,0$ mm de profundidade
IB	Carcinoma invasor com invasão de profundidade > 5 mm (maior que estágio IA), lesão limitada ao colo com o tamanho mensurado no maior diâmetro do tumor ^b
	IB1 Carcinoma invasor > 5 mm de invasão estromal e ≤ 2 cm na maior dimensão
	IB2 Carcinoma invasor > 2 cm e ≤ 4 cm na maior dimensão
	IB3 Carcinoma invasor > 4 cm na maior dimensão
II	O carcinoma se estende além do colo uterino, mas não até o terço inferior de vagina ou parede pélvica
IIA	Envolvimento até dois terços superiores de vagina, sem invasão parametrial
	IIA1 Carcinoma invasor ≤ 4 cm na maior dimensão
	IIA2 Carcinoma invasor > 4 cm na maior dimensão
IIB	Envolvimento parametrial que não atinge a parede óssea

III		O carcinoma envolve o terço inferior de vagina e/ou atinge a parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionante e/ou envolve linfonodos pélvicos e/ou paraórticos
IIIA		Envolvimento da parede inferior de vagina, sem extensão à parede óssea
IIIB		Envolvimento até parede óssea e/ou hidronefrose ou rim não funcionante (a menos que seja de outra causa)
IIIC		Metástases linfonodais pélvicas e/ou paraórticas (incluindo micrometástases ^c) independentemente do tamanho do tumor e da extensão (com anotações r e p) ^d
	IIIC1	Metástases linfonodais pélvicas apenas
	IIIC2	Metástases linfonodais paraórticas
IV		O carcinoma se estende além da pelve verdadeira ou envolve (com biópsia confirmando) a mucosa da bexiga ou do reto. Um edema bolhoso, por exemplo, não permite alocar o caso como estágio IV
IVA		Propagação para órgãos adjacentes
IVB		Metástases a distância

Adaptado de FIGO et al., 2019

a) Imagem e avaliação patológica podem ser utilizadas quando disponíveis para suplementar achados clínicos em relação ao tamanho do tumor e sua extensão, em todos os estádios. A avaliação patológica supera as imagens e os achados clínicos.

b) O envolvimento do espaço vascular/linfático não muda o estágio. A extensão lateral do tumor não é mais considerada.

c) Células tumorais isoladas não mudam o estágio, mas devem ser referidas no laudo.

d) Adicionar anotações para r (imagem) e p (patologia), para indicar o método que foi utilizado para alocar o caso em estágio IIIC. Por exemplo, se for a imagem que detectou a metástase em linfonodo pélvico, o estágio será IIIC1r; se a metástase for confirmada pela patologia, será estágio IIIC1p. O tipo de imagem e a técnica patológica utilizadas deverão sempre ser documentadas.

O câncer cervical tem muitos fatores prognósticos, alguns dos quais, como metástases linfonodais, não foram incluídos no sistema de estadiamento FIGO original. A FIGO publicou um sistema de estadiamento revisado que abrange fatores prognósticos adicionais para facilitar o manejo adequado (Saleh et al., 2020).

Este estadiamento proporciona melhor capacidade discriminatória para mulheres com tumores em estágio IB; entretanto, a classificação de todas as mulheres com linfonodos positivos em um único estágio resulta em um grupo muito heterogêneo de pacientes com taxas de sobrevida altamente variáveis (Wright et al., 2019).

O novo estadiamento do câncer cervical trouxe uma mudança de paradigma ao oferecer a opção de adicionar imagens e patologia ao estadiamento clínico. Isto torna-o aplicável a todos os tipos de situações de recursos em todas as geografias, com implicações para todas as partes interessadas, incluindo ginecologistas, oncologistas ginecológicos, radiologistas, patologistas e radiologistas e oncologistas médicos.

A nova classificação de estadiamento tem mais granularidade, com três subestágios de estágio IB e uma nova categoria de estágio IIIC para todos os casos com envolvimento de linfonodos (LN). As principais limitações do estadiamento clínico foram a avaliação imprecisa do tamanho do tumor e a incapacidade de avaliar os LNs pélvicos e para-aórticos com as investigações limitadas permitidas pela FIGO para alterar o estágio. Isso resultou no subestadiamento dos estágios IB-III e no superestadiamento do estágio IIIB, que foi amplamente superado pela incorporação de achados de imagem. Embora qualquer modalidade de imagem possa ser usada, a ressonância magnética parece ser a melhor modalidade de imagem para doenças em estágio inicial devido à sua melhor resolução dos tecidos moles. Entretanto, o uso de tomografia computadorizada com contraste ou ultrassonografia também são opções viáveis, dependendo da disponibilidade e dos recursos. Mas sempre que a avaliação patológica for possível, ela substitui os achados clínicos e radiológicos (Bhatla et al., 2021b).

3.4.5 Tratamento

As terapias para o câncer cervical são determinadas com base em vários fatores, incluindo o estadiamento (presença de metástase, tamanho do tumor) idade e saúde geral da paciente. As opções de tratamento, incluem cirurgia, radiação e quimioterapia isoladamente ou em combinação, delineadas pela perspectiva de preservação de fertilidade ou não (Abu-Rustum; Yashar, 2023).

O tratamento do câncer cervical é feito principalmente por cirurgia ou radioterapia, sendo a quimioterapia um complemento valioso. A radioterapia externa e a braquiterapia são tratamentos importantes no tratamento do câncer cervical. Para tumores em estágio inicial com fatores de risco locais, a braquiterapia é uma opção pré-operatória. A radioterapia pós-operatória é indicada de acordo com critérios histopatológicos. Para tumores locais avançados,

a quimiorradiação é o tratamento padrão, seguida de reforço de braquiterapia, que não é opcional (Chargari *et al.*, 2022).

A quimiorradioterapia associada (consistindo em quimioterapia à base de platina associada com radioterapia por feixe externo seguida de braquiterapia) foi estabelecida como o padrão internacional de tratamento para a maioria dos estágios de câncer cervical localmente avançado em 1999 (Mayadev *et al.*, 2022). Uma meta-análise de 2017 (Datta *et al.*, 2017) e recente grande ensaio clínico de fase III (Shrivastava *et al.*, 2018) defenderam os benefícios da quimiorradioterapia concomitante em relação à radioterapia isolada. A implementação de radioterapia de intensidade modulada e braquiterapia tridimensional adaptativa guiada por imagem melhorou ainda mais os resultados e reduziu a lesão de órgãos adjacentes (Mayadev *et al.*, 2022).

A quimiorradioterapia associadas é o tratamento padrão para o câncer cervical localmente avançado, que inclui pacientes com doença em estágio IB3 a IVA, e é eficaz para muitos pacientes; no entanto, a mortalidade relacionada com o cancro do colo do útero permanece elevada. A natureza crítica do tratamento do câncer de colo do útero é destacada pelo recente lançamento da iniciativa global da Organização Mundial de Saúde para acelerar a eliminação do câncer de colo do útero, utilizando uma estratégia de intervenção tripla de aumento da vacinação, rastreio e tratamento. A iniciativa exige que 90% de todos os pacientes diagnosticados com câncer de colo do útero recebam o tratamento adequado, mas para atingir este objetivo global existem barreiras significativas relacionadas com a radioterapia que devem ser abordadas (Mayadev *et al.*, 2022).

A cirurgia é adequada para estágios iniciais, onde conização cervical, histerectomia simples ou histerectomia radical podem ser selecionadas de acordo com o estágio da doença. No Estágio IVA, casos selecionados podem ser adequados para exenteração pélvica. Nos estágios IB3 e IIA2, os tumores são maiores e a probabilidade de fatores de alto risco, como linfonodos positivos, paramétrios positivos ou margens cirúrgicas positivas, que aumentam o risco de recorrência e requerem radiação adjuvante após a cirurgia, é alta. Outros fatores de risco que aumentam o risco de recorrência pélvica mesmo quando os linfonodos não estão envolvidos incluem: maior diâmetro do tumor >4 cm, LVSI (linfonodo sentinela negativo) e invasão do terço externo do estroma cervical (Rotman *et al.*, 2006; Sedlis *et al.*, 1999). Nesses casos, tratamento pélvico completo adjuvante a irradiação reduz a taxa de falha local e melhora a sobrevida livre de progressão em comparação com pacientes tratados apenas com cirurgia (Rotman *et al.*, 2006). No entanto, o tratamento de dupla modalidade aumenta o risco de grande morbidade para o paciente.

Nos países de baixa e média renda, a maioria dos pacientes apresenta doença localmente avançada (Dastidar et al., 2016), onde a cirurgia desempenha um papel limitado. Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de técnicas sofisticadas de planejamento e administração e a introdução da tecnologia computacional e de imagem galvanizaram a prática da radioterapia, resultando em melhores resultados clínicos e redução da toxicidade (Dutta et al., 2015; Harkenrider et al., 2015).

Além do seu papel curativo, a radioterapia também pode ser utilizada como terapia adjuvante para pacientes operados para prevenir a recorrência locorregional, embora o papel da “dupla modalidade” seja desencorajado, e como terapia paliativa para aliviar sintomas angustiantes em pacientes com doença incurável avançada (Mayadev et al., 2022).

Pacientes com doença recorrente, persistente ou metastática (inadequada para abordagens terapêuticas curativas) têm um prognóstico sombrio. Até recentemente, esses pacientes eram apenas candidatos à quimioterapia à base de cisplatina mais bevacizumabe. No entanto, a introdução de inibidores de checkpoint imunológico revolucionou o tratamento desta doença, alcançando melhorias históricas na sobrevida global tanto no cenário pós-platina quanto na linha de frente. Curiosamente, o desenvolvimento clínico da imunoterapia no câncer do colo de útero está atualmente a avançar para estágio localmente avançado, embora os resultados preliminares de eficácia neste cenário tenham sido decepcionantes até agora. Além disso, estão a surgir dados promissores de ensaios de fase inicial sobre novas abordagens de imunoterapia, tais como vacinas terapêuticas contra o papilomavírus humano e adoção de terapia celular (Grau et al., 2023).

A quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia não pode ser considerada um tratamento padrão em pacientes com câncer cervical localmente avançado. Esta abordagem necessita de mais investigação clínica para gerar evidências robustas de alta qualidade, especialmente para os subconjuntos que podem potencialmente beneficiar em termos de sobrevivência, toxicidade e qualidade de vida, em comparação com o tratamento padrão-ouro de quimiorradiação associado (Miriyyala et al., 2022).

3.5 Bioprodutos no tratamento do câncer de colo do útero

Os medicamentos naturais possuem diversas estruturas químicas e têm sido uma fonte essencial para a descoberta de drogas. O câncer cervical representa um problema de saúde pública, desenvolve resistência às terapias tradicionais e o custo do tratamento é elevado. Essas desvantagens levaram à busca por terapias alternativas baseadas em compostos bioativos. Os

referidos compostos bioativos incluem compostos fenólicos, flavonóides e taninos (Álvarez-Ortiz et al., 2021).

Um estudo avaliou uma série de piridinas substituídas recentemente sintetizadas, derivado de nafpiridina e pirazolopiridinas substituídas usando ciclopiridona como material de partida. Alguns dos candidatos sintetizados foram avaliados como agentes anticancerígenos contra diferentes linhas celulares de câncer. As atividades citotóxicas *in vitro* contra linhas celulares de carcinoma hepatocelular e cervical foram avaliadas utilizando o ensaio MTT padrão. Diferentes compostos sintetizados exibiram potenciais atividades citotóxicas *in vitro* contra linhagens celulares HepG2 e HeLa. Além disso, em comparação com medicamentos de controle positivo padrão, dois dos compostos mostraram o efeito citotóxico mais potente com valores de IC50 de $8,78 \pm 0,7$, $5,16 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$ e $15,32 \pm 1,2$ e $4,26 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$ para células HepG2 e HeLa, respectivamente (El-Sayed et al., 2019).

A α -mangostina (AM) é um composto derivado de plantas que foi investigado quanto ao efeito apoptótico em células de câncer cervical humano (HeLa). Os efeitos citotóxicos da AM na viabilidade de HeLa e da linha celular ovariana normal humana (SV40) foram avaliados usando o ensaio MTT. Os resultados mostraram que a AM inibiu a viabilidade das células HeLa de maneira dependente da concentração e do tempo, com valor IC50 de $24,53 \pm 1,48$ μM às 24 h. Os efeitos apoptogênicos do AM no HeLa foram avaliados utilizando análise de microscopia de fluorescência (El Habbash et al., 2017).

O efeito do AM na proliferação celular também foi estudado através de ensaio clonogênico. Avaliação da produção de ERO, análise de citometria de fluxo (ciclo celular), avaliação de caspases e múltiplos ensaios de citotoxicidade foram realizados para determinar o mecanismo de apoptose celular. Isto foi associado à parada do ciclo celular da fase G2 / M e à elevação na produção de ERO. AM induziu apoptose mitocondrial que foi confirmada com base no aumento significativo nos níveis de caspases de maneira dose-dependente. Além disso, a ruptura da MMP e o aumento da permeabilidade celular, concomitante com a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, forneceram evidências de que a AM pode induzir a apoptose através da via dependente da mitocôndria. AM exerceu um notável efeito antitumoral e induziu alterações morfológicas apoptogênicas características nas células HeLa, o que indica a ocorrência de morte celular. Este estudo revela que o AM pode ser um potencial composto antitumoral no câncer cervical *in vitro* e pode ser considerado para testes pré-clínicos e *in vivo* do câncer cervical (El Habbash et al., 2017).

Duas novas hidroxiantraquinonas, harzianumnonas A e B, juntamente com sete análogos conhecidos, foram isoladas do fungo *Trichoderma harzianum* (XS-20090075), derivado de

coral mole. Suas estruturas químicas foram elucidadas por extensa investigação espectroscópica. Dois dos compostos análogos exibiram citotoxicidade contra a linhagem celular de hepatoma HepG2 com valores de IC50 de 2,10 e 9,39 μM , respectivamente. Descobriu-se ainda que um deles apresentou citotoxicidade contra a linha celular de câncer cervical HeLa com um valor IC50 de 8,59 μM (Shi et al., 2018).

Em 2016 uma nova flavona, penimethavona A, possuindo um grupo metil único e raro no anel B, foi isolada do fungo *Penicillium chrysogenum* cultivado a partir de uma gorgônia *Carijoa sp.* coletados no Mar da China Meridional. A estrutura foi elucidada por extensa análise espectroscópica e por comparação com composto conhecido relacionado. O Composto apresentou citotoxicidade seletiva e moderada contra linhagens celulares de câncer cervical (HeLa) e rabdomiossarcoma com valores de IC50 de 8,41 e 8,18 μM , respectivamente (Hou et al., 2016).

Um biossurfactante produzido pelo fungo demáceo *Exophiala dermatitidis* SK80 (isolado de solo contaminado com óleo de palma), se deu por catálise de óleo vegetal, suplementado com meio basal. O biossurfactante foi purificado, de acordo com as propriedades do surfactante, por fracionamento com solvente utilizando cromatografia em coluna de sílica gel. A estrutura química do composto tensoativo mais forte foi elucidada através do uso de RMN e espectroscopia de massa, e observou-se que era monooleína, que então demonstrou atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de câncer cervical (HeLa) e leucemia (U937) de forma dose-dependente. Não foi observado citotoxicidade com células normais, mesmo quando foram utilizadas concentrações elevadas. Observou-se que alterações morfológicas celulares e de DNA, em ambas as linhagens de células cancerígenas, eram encolhimento celular, formação de bolhas na membrana e fragmentação do DNA (Chiewpattanakul et al., 2010).

3.6 Gênero *Rhizopus sp*

Rhizopus é um gênero de fungos zigomicetos saprotróficos (Mucoromycotina, Mucoromycota) que é onipresente no solo, excrementos de animais e vegetação em decomposição (Gryganskyi et al., 2018). A ordem Mucorales é um antigo grupo de fungos classificados no subfiló Mucoromycotina. Mucorales são principalmente saprotróficos de rápido crescimento que pertencem aos primeiros colonizadores de diversos materiais orgânicos e representam uma parte permanente do ambiente humano. Várias espécies são capazes de causar infecções humanas (mucormicoses) predominantemente em pacientes com sistema imunológico debilitado, diabetes ou trauma profundo (Walther; Wagner; Kurzai, 2020).

O gênero *Rhizopus* é de longe o agente causador mais importante de mucormicose em todo o mundo e a principal causa de infecções rino-orbital-cerebrais. Doença pulmonar, cutânea e disseminada manifestações também são frequentemente relatadas. A maioria dos casos é causada por duas espécies: mais frequentemente por *R. arrhizus* (sin. *R. oryzae*), seguida por *R. microsporus* (Jeong et al., 2019). O gênero *Rhizopus* é caracterizado pela formação de esporangióforos pigmentados e não ramificados que surgem isoladamente ou em espirais e que apresentam esporângios com apófise. Os rizóides são formados em oposição aos esporangióforos (“A Revision of the Genus *Rhizopus*. 1”, 1985; Zheng et al., 2007). Análises filogenéticas do parasita cogumelo, *Syzygites megalocarpus*, e do parasita de inseto, *Sporodiniella umbellate*, revelaram a natureza parafilética do gênero, com ambos os táxons agrupados entre as espécies de *Rhizopus* (Hoffmann et al., 2013; Wagner et al., 2020).

O gênero *Sporodiniella* compartilha várias características com *Rhizopus* sp ambos possuem esporangióforos pigmentados e os esporângios são apofisados. Em contraste com *Rhizopus*, os esporangióforos de *Sporodiniella* estão dispostos em umbelas. *Rhizopodopsis* e *Zygambella* (Nagalakshmi; Jothi; Subrahmanyam, 2008) também formam esporangióforos umbelados com uma apófise e possivelmente pertencem a esta relação, mas nenhum dado de sequência está disponível.

Em contraste com o inseto parasita *Sporodiniella*, *Rhizopodopsis* foi isolado de frutos caídos da planta *Elaeagnus* e *Zygambella* do solo. Com base em dados morfológicos e moleculares (Hoffmann et al., 2013) (Abe; Asano; Sone, 2010; Dolatabadi et al., 2014a, 2014b; Li et al., 2016; M.A.A., 1984; Walther et al., 2013; Zheng et al., 2007), aceita-se as seguintes espécies de *Rhizopus*: *R. americanus*, *R. caespitosus*, *R. homothallicus*, *R. lyococcus*, *R. microsporus*, *R. schipperae*, *R. koreanus*, *R. arrhizus* (com as variedades *arrhizus* (sin. *R. oryzae*) e var. *delemar* que são tratadas como espécies discretas por alguns autores, *R. sexualis* e *R. stolonifer*. O recentemente descrito *R. koreanus* é uma espécie irmã de *R. stolonifer* que difere deste último apenas ligeiramente pelo tamanho das columelas (Li et al., 2016).

A espécie já foi detectada como uma espécie irmã críptica de *R. stolonifer* com base em sequências ITS (Walther et al., 2013) e provavelmente também por padrões de DNA polimórfico amplificado (RAPD) (Vágvölgyi et al., 2004).

3.6.1 *Rhizopus microsporus*

Três espécies relacionadas com *R. microsporus* que se distinguem apenas pela forma, tamanho e ornamentação dos esporangiósporos foram reduzidas na classificação devido a testes de acasalamento positivos (M.A.A., 1984) e posteriormente tratadas como variedades de *R.*

microsporus, nomeadamente *var. chinensis*, *var. oligosporus* e *var. rhizopodiformis*. Mais tarde, variedades adicionais, *var. azygosporus* (Zheng et al., 2007) e *var. tuberosus* (Zheng; Chen, 1998) foram descritas. Normalmente, as cepas domesticadas de origem alimentar com esporulação reduzida e irregular foram atribuídas à variedade *oligosporus*, enquanto as cepas clínicas foram atribuídas principalmente à *var. rizopodiforme*. No entanto, em abordagens baseadas em sequência (Abe; Asano; Sone, 2010; Dolatabadi et al., 2014b; Liu; Huang; Zheng, 2007; Walther et al., 2013) essas variedades não foram detectadas. Análises filogenéticas de três loci (*its*, *act*, *tef*) revelaram recombinação entre dois dos três subgrupos dentro de *R. microsporus*, com ambos os grupos contendo todas as variedades morfológicamente definidas (Dolatabadi et al., 2014b). Não houve correlação entre os subgrupos definidos filogeneticamente e as variedades. Com base nesses resultados, as variedades de *Rhizopus microsporus* foram reduzidas a sinônimos (Dolatabadi et al., 2014b). No nível do genoma, esta espécie mostra um grande grau de diversidade molecular (Gryganskyi et al., 2018).

Com base na taxonomia morfológica desenvolvida por Schipper, *Rhizopus* sp. foi reclassificado em três grupos: o grupo *Rhizopus oryzae*, o grupo *R. microsporus* e o grupo *R. stolonifer* (M.A.A., 1984). Apesar de algumas pequenas variações, isolados de *Rhizopus*, como *R. arrhizus*, *R. delemar* e *R. javanicus*, foram combinados na mesma espécie, *R. oryzae* (M.A.A., 1984). A classificação baseada na taxonomia molecular indica que *R. oryzae* pode ser dividida em *R. oryzae* e *R. delemar* (Abe et al., 2007) e que *R. niveus* pode ser reclassificado como *R. delemar* (Abe; Asano; Sone, 2010).

3.6.2 *Rhizopus arrhizus*

Rhizopus arrhizus é membro de um complexo de espécies de fungos associados ao solo, distribuídos em todo o mundo, que causam deterioração de vegetais e frutas. *R. arrhizus* também é amplamente utilizado na indústria alimentícia na produção de alimentos fermentados e em outras indústrias biotecnológicas, como pesquisa e desenvolvimento de novos compostos terapêuticos. Esta espécie foi isolada de plantas e animais, e pode causar doenças em humanos (Corzo-León; Uehling; Ballou, 2023).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e identificação do fungo *Rhizopus*

O gênero *Rhizopus* sp. utilizado neste trabalho foi isolada do ar., que pertence a coleção de fungos do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) (Figura 1).

A cepa foi repicada em Ágar Sabouraud-Dextrose (SDA) e incubados a 25°C por 7 dias. Após o período de crescimento foi realizada a análise macroscópica como: textura e coloração do anverso e reverso de cada colônia. Para verificar as características microscópicas utilizou-se a técnica de microcultivo, seguindo os protocolos já existentes no Laboratório de Micologia do NIBA - UFMA.



Figura 1. Tubo de ensaio com colônia de *Rhizopus* sp – Coleção de fungos do NIBA.

4.2 Identificação molecular por PCR

4.2.1-Cultura e Isolamento fúngico

O fungo filamentoso identificado previamente como pertencente ao gênero *Rhizopus* sp. da coleção de fungos do Laboratório de Micologia do NIBA foi utilizado para essas análises. O cultivo dos fungos foi realizado em placas de Petri de meio cultura Sabouraud Dextrose 4% (MERCK) e incubados em estufa bacteriológica (SOLAB SL-101) a 37 °C por 5 dias (Figura 2). Todos os procedimentos de cultivo e repicagem ocorreram em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bunsen.

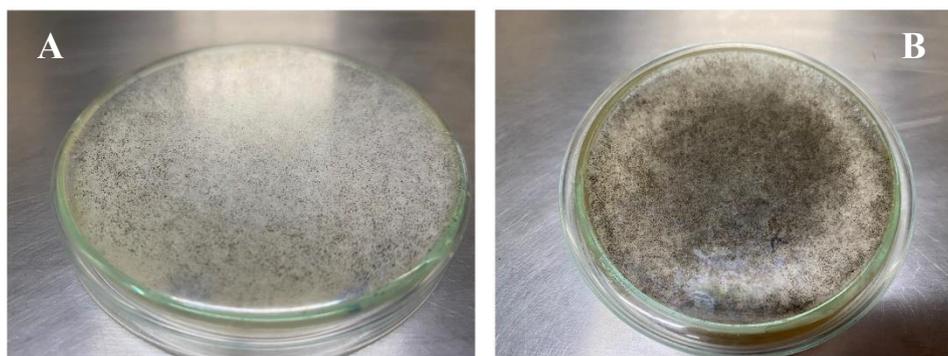


Figura 2. Colônia *Rhizopus sp* (placa de petri) - 3° (A) e 5° (B) dia de crescimento.

4.2.2 Extração de DNA

Foi utilizado o protocolo bioquímico de extração de DNA seguindo metodologia de Valenzuela-Lopez *et al.* (2017) com adição de esférulas de vidro e adaptações para realização de lise celular da parede de quitina. Posteriormente verificou-se a qualidade do DNA, seguida de quantificação de DNA e pureza em espectrofotômetro Nanodrop One C Thermo Scientific. As amostras continham entre 50-100 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ e seguiram para a amplificação através da reação em cadeia da polimerase.

4.2.3 Primers e Reação em cadeia da Polimerase -PCR

Para análise molecular foram utilizados primers (ThermoFisher- Scientific) da região do espaçador interno transcrito (ITS) e fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 (White *et al.*, 1990). As sequências de nucleotídeos utilizados foram ITS 1 – F- TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS 4 (R- GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG) de acordo com Oskiera *et al.* (2015).

Reação da cadeia em polimerase (PCR) das regiões tiveram volume final de 25 μl , com a utilização de Conjunto para PCR MasterMix (Ludwig Biotecnologia) contendo Tris-KCl, pH 8,4; 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM DNTP mix e 2,5 U de Taq DNA polymerase; 12,5 μl de Pré-Mix; 6,5 μl de água ultra pura; 2,5 μl dos primers ITS1 e ITS4 (Termofisher Invitrogen 10 pmol/1 mL⁻¹) 1,0 μl DNA (5 ng mL⁻¹) e seguindo as seguintes condições de termociclagem no equipamento Termocicladores Biocycler MJ96G.

A descrição dos ciclos de PCR realizados para amostras de *Rhizopus sp.* foi de 95 °C por 8 min, 34 ciclos 94° C por 1 min, 57° C por 1 min e 72 C por 1 min e depois 72 C por 7 min para extensão e finalizando em 4 °C. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 1,5 % a 90 V por 120 minutos em TBE 1X (Ludwig Biotecnologia). Os produtos

foram avaliados quanto a qualidade em transluminador (Loccus L-PIX TOUCH) (Vilber Lourmat ECX-F20.M).

4.2.4 Preparo dos Extratos de *Rhizopus sp*

O preparo dos extratos de *Rhizopus sp* foi realizado adicionando pequenos discos dos micélios, de aproximadamente 6 mm, em Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (Figura 3) e incubados para fermentação durante 22 dias a 25°C. Em seguida, o caldo fermentado foi separado da biomassa micelial, pelo processo de filtração de Buchner (Figura 4).



Figura 3. Adição de fragmentos da colônia de *Rhizopus sp* em Caldo Sabouraud Dextrose.



Figura 4. Após 22 dias o extrato foi filtrado gerou o Extrato de *Rhizopus sp* (extracelular) Caldo e Extrato de *Rhizopus sp* (intracelular) Micélio.

No caldo fermentado filtrado, foi adicionado Etanol PA na proporção 1:1, por um período de 24h, e concentrado em evaporador rotatório. Posteriormente foi adicionado no

extrato alcoólico fúngico o solvente acetato de etila (AcOEt) na proporção 1:1, particionado em funil de separação por 24 horas. Separou-se a fase orgânica da fase aquosa, em seguida a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório (Figura 5).

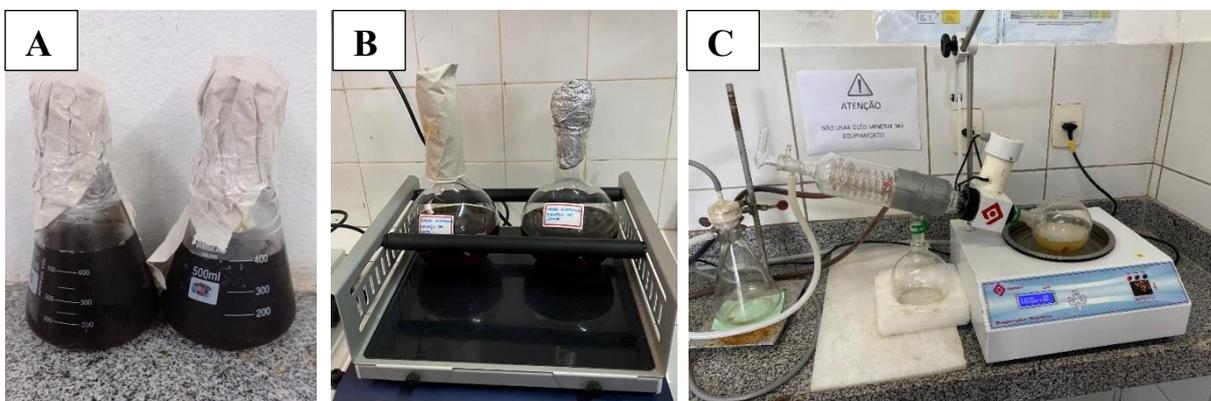


Figura 5. Extrato de *Rhizopus sp* (extracelular) filtrado e acrescido de etanol (A), após acréscimo de etanol ficou em agitação por 24h (B), fase orgânica (Acetato de etila) foi concentrada em evaporador rotatório (C).

O concentrado foi liofilizado em liofilizador da marca Liotop modelo L101. As condições foram: sistema em vácuo abaixo de 500 microHg e temperatura a -50°C . Ciclo de liofilização de 48 horas, originando o extrato de (AcOEt). Este processamento contou com a estrutura do Laboratório do Instituto Federal do Maranhão (IFMA) - Campus São Luís-MA, em parceria com o Departamento de Química.

4.3 Análise Química do Extrato de Fungo por Orbitrap-MS

As amostras do extrato fúngico liofilizado foram preparadas na concentração $1,00\text{ mg mL}^{-1}$ em metanol contendo $0,1\%$ v/v de HCOOH (ESI positivo) ou $0,1\%$ v/v de NH_4^{OH} (ESI negativo). Posteriormente as amostras foram diluídas 100 vezes usando metanol contendo $0,1\%$ v/v de HCOOH ou NH_4^{OH} e injetadas diretamente (infusão direta) na fonte de ESI a um fluxo de $10\ \mu\text{L min}^{-1}$. A faixa dinâmica de aquisição de íons no analisador do tipo Orbitrap Q-Exactive Plus (Thermo Scientific, Bremen, Germany) foi de m/z 100-1000, onde: i) sheath gas-flow rate = 10; ii) sweep gas-flow rate = 0; iii) spray voltage = 3000 V no ESI(-) e 3500 V no ESI(+); vi) temperatura do capilar = 350°C ; v), fluxo do gás auxiliar = 5; e vi) S-Lens = 50.

Os espectros foram adquiridos com a acumulação de 100 scans. As análises foram realizadas nos modos positivo com poder de resolução de 140000 no m/z 200. A calibração externa para o modo ESI (+) foi realizada utilizando uma solução contendo cafeína, MRFA (Met-Arg-Phe-Ala Acetate Salt) e Ultramark® 1621. Para o modo ESI (-) foi utilizada uma solução contendo dodecil sulfato de sódio, tauracolato de sódio e Ultramark® 1621 (Thermo

Scientific, Bremen, Alemanha). Os espectros de massas foram adquiridos e processados utilizando o programa Xcalibur, versão 2.2 (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A identificação dos compostos foi realizada por meio da determinação da fórmula molecular (C₂₂H₃₈N₂O₂) com base na massa exata e pela comparação com estudos prévios na literatura que investigaram matrizes semelhantes (Birch et al., 1998; Jiang et al., 2022a; Mazumder et al., 2021; Nielsen et al., 2009; Saldan et al., 2018)

4.4 Preparo da Microemulsão

4.4.1- Construção do Diagrama de Fases Pseudoternário

As microemulsões foram preparadas usando o método de titulação convencional descrito por Bomfín (2021), para isso, foram utilizadas misturas de miristato de isopropila com o tween 80/álcool isopropílico (3:1) nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Cada uma das misturas obtidas foi titulada com água, sob agitação magnética. O ponto de viragem da titulação foi determinado pela mudança óptica como início da turbidez ou separação de fases (Figura 6).

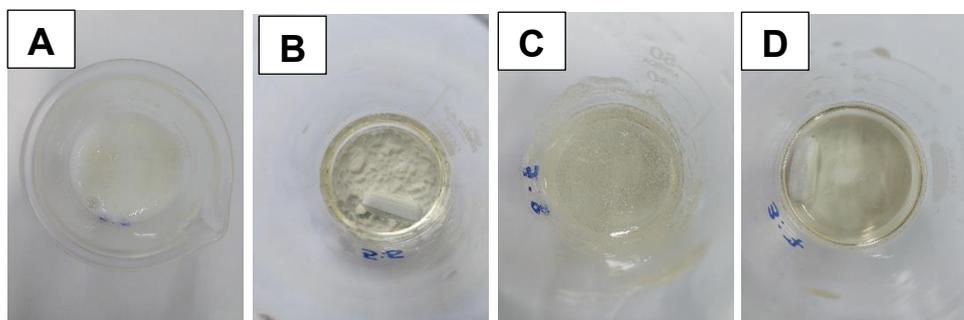


Figura 6. Microemulsões obtidas com diferentes concentrações do miristato de isopropila, e uma fase surfactante/cosurfactante (proporção de 3:1). A-Emulsão. B-formação de fases. C-formação de gel. D-Microemulsão.

Os experimentos foram realizados em triplicata para verificar a reprodutibilidade. A partir da composição do ponto final das amostras tituladas, a composição percentual em volume dos componentes como óleo, surfactante e água foi calculada e plotada em coordenadas triangulares para construir diagramas de fase pseudoternários através do programa Origin 8.0, delimitando assim, a área correspondente a microemulsão. A partir da região de microemulsão no diagrama de fases pseudoternário, foi selecionada e preparada uma formulação para o desenvolvimento de microemulsões.

4.4.2 Preparo da Microemulsão carregada com Extrato de Fungo

A microemulsão foi constituída por formulação de 30% de Miristato de Isopropila P.A. (fase oleosa), 60% de Tween 80/Álcool isopropílico (3:1) (surfactante/cosurfactante) e 10% de água destilada (fase aquosa). Para isso, primeiramente foi realizada a combinação da fase oleosa com o surfactante/cosurfactante. A fase aquosa (água destilada) foi incorporada gota a gota sob agitação magnética (50 rpm) e, após 15 minutos nessa condição, passou pelo processo de filtração.

A microemulsão contendo o extrato de fungo foi misturado com a fase oleosa, (miristato de isopropila) a uma concentração de 9000 µg/mL. Esse óleo foi então misturado com uma combinação de surfactante (Tween 80) e cosurfactante (álcool isopropílico) sob agitação constante. Gradualmente, gota a gota, água foi adicionada ao sistema com vigorosa agitação, mantendo a temperatura ambiente. Esse processo foi conduzido utilizando a formulação mais eficaz até que uma microemulsão transparente fosse obtida. Após a formação da microemulsão carregada com a extrato de fungo, esta foi submetida a um período de equilíbrio sob agitação magnética suave, que durou 15 minutos. Em seguida, a microemulsão foi submetida a uma filtração por meio de papel de filtro Whatman (nº 40) para purificação e isolamento dos componentes desejados.

4.4.3 Caracterização da Microemulsão

4.4.3.1 Tamanho hidrodinâmico das micropartículas e índice de polidispersividade (PDI)

Tamanho hidrodinâmico da microemulsão é realizada utilizando-se a técnica de DLS (Dynamic Light Scattering) com o auxílio do equipamento Zetasizer (malvern zetasizer ver.7.03, mal1098091). Para a medida do tamanho gotas por DLS, as amostras foram preparadas a partir de uma diluição 1:1000 da formulação em água destilada. Desta análise obtém-se a distribuição de tamanhos, o tamanho médio e o índice de polidispersão. A análise neste trabalho se deu de forma qualitativa, isto é, um menor PDI é indicativo de uma menor dispersão de tamanhos, logo, maior homogeneidade de material.

4.4.3.2 Determinação do tamanho das partículas e potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram realizados também no equipamento ZetaSizer da Malvern. As suspensões da microemulsão foram diluídas a uma concentração de 1:1000 e levadas ao equipamento com o auxílio de uma cubeta, onde foi realizada a análise.

4.4.4 Controle da qualidade das microemulsões desenvolvidas

Observou-se macroscopicamente, por 15 dias, características como transparência, separação de fases e formação de precipitados. O pH foi medido em pHmetro de bancada (HANNA INSTRUMENTS, HI2221), calibrado com soluções padrões de 4,01, 7,01 e 10,01. As medidas foram determinadas através da imersão do eletrodo em 20 mL de amostra e estabilização do equipamento. O índice de refração foi obtido em refratômetro ABBE de bancada (QUIMIS, 07678, Brasil). Calibrado com água destilada. A condutividade foi avaliada utilizando um condutivímetro microprocessado (QUIMIS, Brasil), através da imersão do sensor e termômetro em 20 mL das formulações.

4.5 Determinação quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato da microemulsão de *Rhizopus sp*

A determinação de fenólicos totais do extrato da microemulsão de *Rhizopus* foi realizada através do método colorimétrico quantitativo de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2012). Com curva padrão expressa em ácido gálico (5 a 100 μg ácido gálico mL^{-1}). Em que o teste foi realizado com 2,0 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v), e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v) e 200 μL da concentração 1000 μg mL^{-1} da amostra (extrato da microemulsão de *Rhizopus sp*), após homogeneização e abrigo de luz por 30 min., foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod.Q-898U2M5) a 760nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. O teor de fenólicos totais foi calculado utilizando a equação de regressão obtida a partir da curva de ácido gálico.

A determinação dos teores de flavonoides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998) com adaptações. Para o estudo utilizou-se alíquotas de 3,0 mL das amostras em estudo na concentração de 1000 μg mL^{-1} com a adição de 300 μL de solução etanólica de Cloreto de alumínio 5% (AlCl_3), foi homogeneizada e colocada sob abrigo de luz por 30 min. Para posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod.Q-898U2M5) a 420 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão de quercetina (5 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides totais, sendo os resultados expressos em mg de quercetina por grama da amostra.

4.6 Atividade biológica *in vitro* do extrato da microemulsão de *Rhizopus* sp

4.6.1- Atividade Antimicrobiana

4.6.1.1- Estirpes bacterianas e condições de cultura

Para a realização dos testes antimicrobianos foram utilizadas cepas padrões as cepas microbianas da American Type Culture Collection (ATCC), *Escherichia coli* (Migula) Castellani e Chalmers (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 12600™), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC® 27853™) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann e Edwards) Le Minor e Popoff sorovar Choleraesuis (ATCC® 12011™), foram testadas em uma concentração celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL seguindo a escala McFarland, recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

4.6.1.2 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) pelo método de microdiluição em microplacas

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se uma cultura de 24h, em um tubo contendo solução salina estéril até atingir a turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) no qual foi verificado pela leitura espectrofotométrica a 600nm e a absorbância de 0,10 a 0,15 corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Em uma microplaca estéril de 96 poços, foram utilizados 100 µL de extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp preparados em solução-estoque de Caldo Mueller–Hinton (CMH) com 0,1% de DMSO. Cada amostra foi verificada em sete concentrações bacterianas (500 a 7,8125 µg/mL) para potencial antimicrobiano ideal. Apenas o meio CMH foi adicionado ao controle negativo para garantir a esterilidade do meio. Controle positivo foi gentamicina (32 a 0,5 µg/mL) usado para cepas amplo espectro preparados em solução-estoque de Caldo Mueller–Hinton (CMH) com 0,1% de DMSO.

As placas foram incubadas durante 24h, após a incubação foi acrescentado 20 µL de uma solução de resazurina a 3%, foram adicionados a cada poço e incubados por mais 4 h, após a incubação, foi realizada a leitura visual final, no qual observamos na placa a coloração azul nos poços que foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento bacteriano.

A CIM foi definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas, ou seja, a menor concentração de extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa.

Após a determinação da CIM, foram retirados 100 µL para subcultivo (em triplicata) em placas de ágar padrão de contagem (PCA) contendo a concentração considerada inibitória e as concentrações imediatamente superiores. Após 24 horas de incubação a 35°C ± 2, a concentração bactericida mínima (CBM) foi a que apresentou menor ou igual a 20 unidades formadora de colônias por mL (UFC/mL) no PCA.

4.6.1.3 Estirpes de leveduras e condições de cultura

Para a realização dos testes antimicrobianos foram utilizadas cepas padrões as cepas microbianas da American Type Culture Collection (ATCC) de três espécies de *Candida*: *C. albicans* ATCC 443-805-2, *C. parapsilosis* ATCC 726-42-6 e *Candida tropicalis* ATCC 1036-09-2 foram obtidas do acervo da Coleção de Fungos do Laboratório de Imunologia e Micologia –NIBA/UFMA, foram testadas em uma concentração celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL seguindo a escala McFarland, recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

4.6.1.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) pelo método de microdiluição em microplacas

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição, executada em triplicata, utilizando microplacas, contendo 96 orifícios (Kasvi, Itália). Em cada poço da placa, foram adicionados 100 µL do meio líquido RPMI (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, 100 µL dos produtos (amostra em estudo), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, que foram diluídos seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, obtendo-se concentrações de 1000 até 1,95 µg/mL.

Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das leveduras na concentração de 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Foram feitos controles de viabilidade das cepas fúngicas e do meio de cultura líquido RPMI 1640 nas mesmas condições do ensaio. As placas foram seladas e incubadas a 35±2°C por 24-48h.

Após a incubação foi acrescentado 20 µL de uma solução de resazurina a 3%, foram adicionados a cada poço e incubados por mais 4 h, após a incubação, foi realizada a leitura visual final, no qual observamos na placa a coloração azul nos poços que foi interpretada como ausência de crescimento levedura e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento de leveduras.

A CIM foi definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas, ou seja, a menor concentração de extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa. Após a determinação da CIM, foram retirados 100 µL para subcultivo (em triplicata) em placas de ágar Sabouraud dextrose (ASD) contendo a concentração considerada inibitória e as concentrações imediatamente superiores. Após 48 horas de incubação a 35°C ± 2, a concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a concentração que apresentou menor ou igual a 20 unidades formadora de colônias por mL (UFC/mL) no ASD.

4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH

A avaliação da atividade antioxidante do extrato *Rhizopus* sp e da microemulsão de *Rhizopus* sp foi conduzida utilizando as técnicas de DPPH com base na metodologia de Brand-Williams e Berset (1995) e ABTS conforme proposto por Re et al. (1999) com adaptações de Teles et al. (2021).

Inicialmente, as amostras foram medidas em triplicata, com concentrações variando de 1000 a 250 µg/mL para ambas as técnicas (DPPH e ABTS). Para realizar as medições, 100 µL de cada solução foram transferidos para tubos de ensaio, seguidos pela adição de 3000 µL da solução do respectivo radical ser testado, foram homogeneizados, e mantido em ambiente escuro por 6 minutos para a técnica ABTS e por 30 minutos para a técnica DPPH. O etanol foi utilizado como controle (branco). Após o abrigo de luz as absorbâncias foram lidas para o DPPH (517nm) e ABTS (734), foi possível construir a curva "concentração vs. absorbância" para cada amostra.

A curva-padrão foi preparada usando soluções de trolox (10 a 1000 µM), em triplicata, para ambas as técnicas (ABTS e DPPH). O procedimento para a leitura das curvas-padrão foi o mesmo descrito para as amostras, com a exceção do volume de padrão utilizado (30 µL). Para calcular a concentração de 1000 µM de trolox correspondente à absorbância "y" obtida, substituímos o valor de "x" na equação da curva-padrão. Em seguida, nas equações das retas geradas pelas amostras, substituímos o valor de "y" pela absorbância correspondente a 1000 µM de trolox calculada. Isso nos permitiu determinar a diluição da amostra equivalente a 1000 µM de trolox. Os valores de "x" encontrados foram convertidos em gramas, e a atividade antioxidante foi expressa em µM trolox/g da amostra.

Foi ainda realizado a determinação do EC50 do trolox, em que inicialmente foi preparada a curva-padrão utilizando soluções de ABTS (50 a 1000 µM) e DPPH (50 a 1000

μM). A partir da equação linear obtida, substituiu-se o valor de "y" pela metade da absorbância inicial do grupo controle. Isso permitiu determinar a quantidade de ABTS correspondente, expressa em μM , conforme descrito por Rufino et al. (2007).

Usando as equações de reta obtidas das amostras, substituímos novamente o valor de "y" pela metade da absorbância inicial do grupo controle. Isso nos permitiu determinar o valor de "x", que representa a Concentração Efetiva (EC_{50}). A EC_{50} é a concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do ABTS e DPPH.

Para expressá-la em g amostra/g de ABTS ou DPPH, utilizou-se a equação:

$$W = \frac{\text{EC}_{50} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) / 1000}{X}$$

Onde x é a concentração de ABTS ou DPPH encontrada pela equação da curva-padrão do ABTS, após transformação para gramas.

4.6.3 Atividade Antitumoral

4.6.3.1 Cultivo Celular

As células HeLa, Vero, Caco-2 e SiHa foram mantidas em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e antibiótico 1% (estreptomicina e penicilina) em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C . A linhagem PC-3 e B16-F10 foram mantidas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e antibiótico 1% (estreptomicina e penicilina) em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C .

4.6.3.2 Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT

Para avaliar se os extratos e microemulsão de *Rhizopus* sp apresentam atividade anticancerígena as amostras foram inicialmente testadas em linhagens celulares HeLa, PC-3, B16-F10 e células VERO para controle. Para o extrato extracelular de *Rhizopus* sp, e extrato biomassa de *Rhizopus* sp as diferentes concentrações avaliadas foram 1000; 500; 100 e 20 $\mu\text{g/mL}$, e para Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp e microemulsão (Branco) as diferentes concentrações avaliadas foram 1000;500;100, 20 e 2 $\mu\text{g/mL}$.

As linhagens celulares foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura. As células foram plaqueadas em uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL, adicionando 100 μL nos poços da placa de 96 poços, e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO_2 .

Foi adicionado os extrato extracelular de *Rhizopus* sp, extrato biomassa de *Rhizopus* sp, Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp e microemulsão (Branco) e incubadas por 24h.

Após as 24h, foi adicionado 50 µL de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), na concentração de 2 mg/mL. A placa foi novamente incubada por 4 h a 37 °C 5% de CO₂ (protegida da luz) e adicionado 150 µL de DMSO, seguido da leitura em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) a 570 nm. A concentração inibitória para 50% das células (CI₅₀) foi determinada como a concentração capaz de reduzir 50% da densidade óptica das células tratadas em comparação com o controle negativo e, feito a análise por meio de regressão não linear. Os testes foram realizados em triplicata.

4.7 Aspectos éticos

Por se tratar de uma pesquisa envolvendo coleta e análise de representantes de origem fúngica, este estudo foi submetido e aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO, com número de cadastro 91276-1.

4.8 Análise estatística

Para análise estatística, realizou-se o teste one-way analysis of variance (ANOVA), seguido pelos pós-testes de Dunnet ou Tukey's, de acordo com o tipo de análise. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. Utilizou-se para a análise o programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Identificação macro e microscópica de *Rhizopus* sp

A identificação macroscópica foi realizada ao verificarmos que *Rhizopus* cobre rapidamente a superfície do ágar com crescimento denso semelhante ao algodão doce, as colônias são inicialmente brancas e depois cinza ou marrom-amareladas. O reverso é branco a tons claros de cinza ou marrom como pode ser verificado na Figura 7.

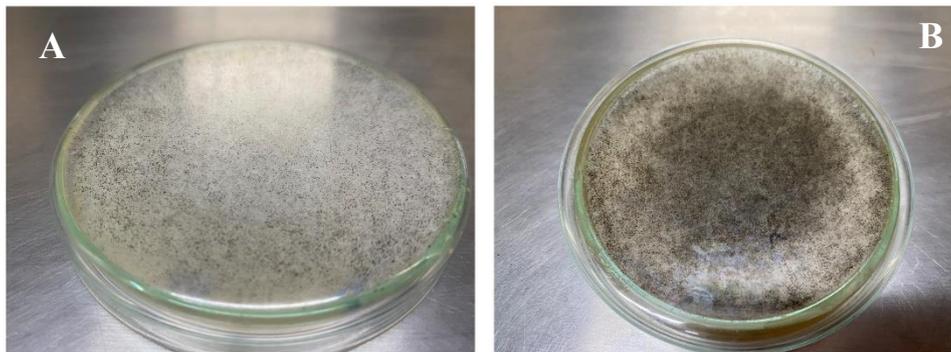


Figura 7. Identificação Macroscópica do *Rhizopus*- (A) Colônia em PDA com abundante micélio algodoado, (B) Colônia com esporângios pretos.

Ao verificarmos no microscópio ótico confirmamos a apresenta *Rhizopus* pois visualizamos Hifas largas sem septos, numerosos estolões entre os micélios, conectando grupos de longos esporangióforos não ramificados. Os esporangióforos são longos e terminam com um esporângio redondo e escuro contendo uma columela e muitos esporangiósporos ovais, incolores ou marrons (Figura 8).



Figura 8. Identificação Microscópica de *Rhizopus* sp. (A) Esporângios globosos multiesporados preto (B) Esporangióforo e columela subglobosa a globosa (C) Esporangiósporos e Rhizóide basal.

5.2 Identificação molecular por PCR

Após a identificação macro e microscópica de *Rhizopus* sp, foi verificado por biologia molecular pela técnica de PCR, que a amostra é pertencente ao gênero *Rhizopus* sp. A eletroforese resultou em um fragmento de aproximadamente 214 pb, o que corrobora com o que está descrito na literatura (Figura 9).

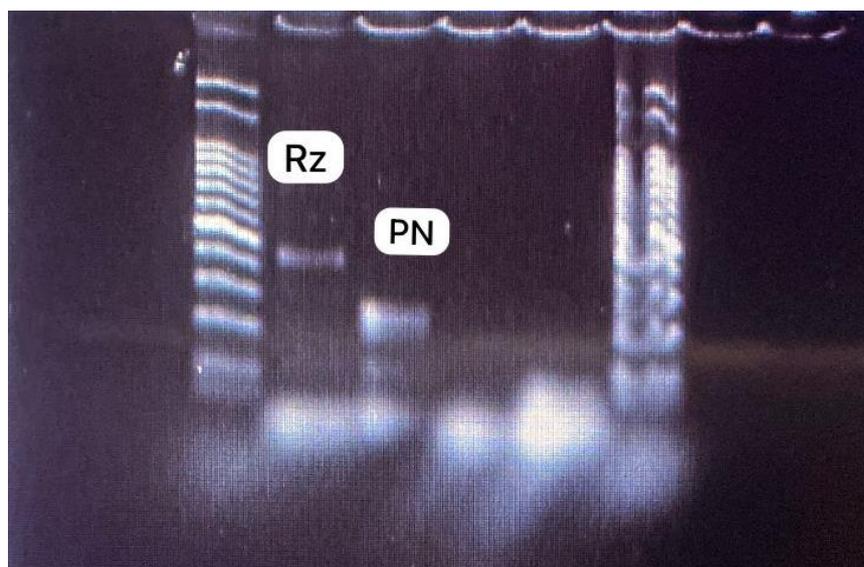


Figura 9 – Gel de eletroforese a 1,5% contendo amostras do gênero *Rhizopus* sp. e espécie *Penicillium citrinum*. Rz (amostra de *Rhizopus* sp.) e PN (amostra da espécie *Penicillium citrinum*).

5.3 Análise Química do Extrato de Fungo por Espectrometria de Massa Orbitrap (Orbitrap-MS)

Analisando o extrato de fungo de *Rhizopus* sp por Espectrometria de Massa Orbitrap, foi possível verificar na Figura 7 o espectro de massas usando espectrometria de massa ESI (+) Orbitrap-MS. Em principais resultados observados incluem os picos de massa que representam as diferentes espécies iônicas presentes no extrato. A altura dos picos reflete a abundância relativa das diferentes espécies iônicas. Quanto mais alto o pico, maior a abundância. Alguns compostos identificados foram marcados e etiquetados nos picos correspondentes.

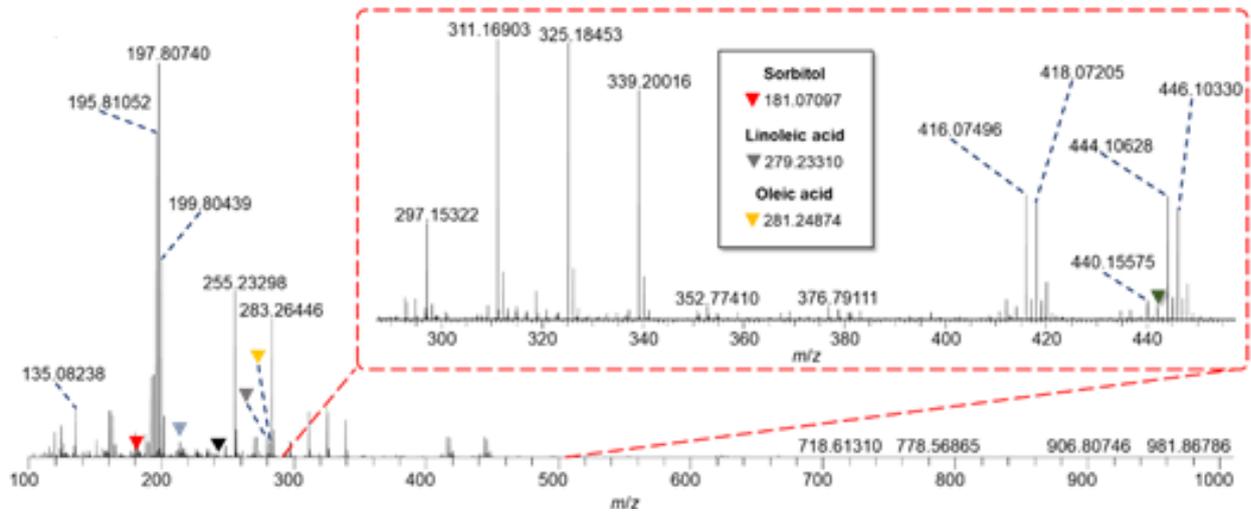


Figura 10. Espectro de massas ESI (+) Orbitrap-MS realizado no extrato de fungo de *Rhizopus sp.*

Foi possível identificar 13 compostos que podem ser observados na Tabela 4 através do seu espectro de massas ESI (+) Orbitrap-MS.

Tabela 4. Compostos identificados no ESI (+) Orbitrap-MS realizado no extrato de fungo de *Rhizopus*.

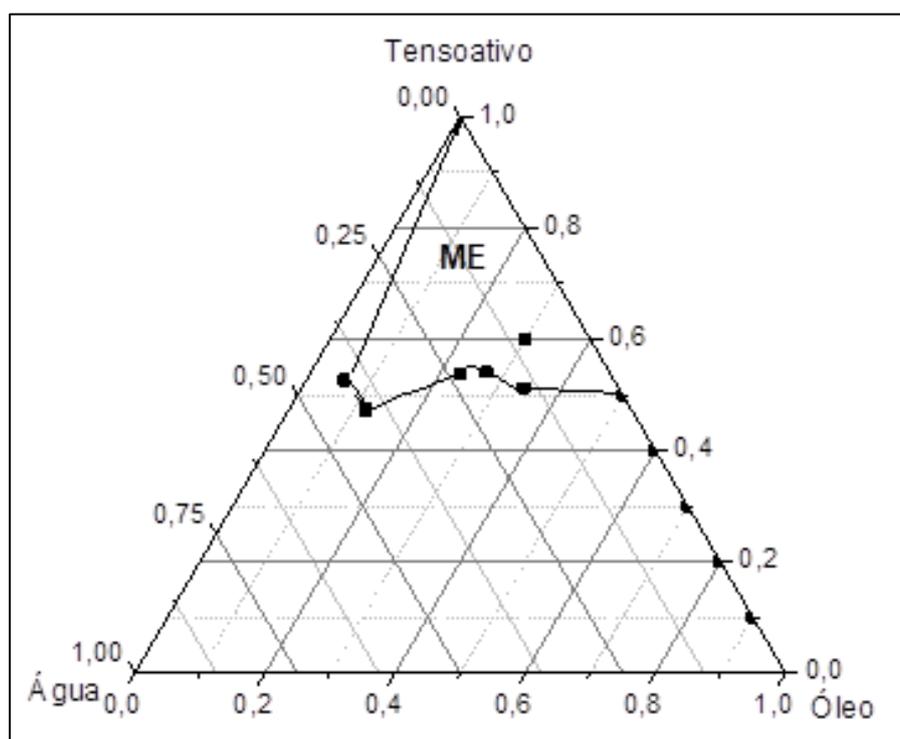
Identificação	Sinal	m/z_{teo}	Extrato de fungo de <i>Rhizopus</i>		DBE
			m/z_{exp}	Error	
1,6-Anidro- β -glicose	[C ₆ H ₁₀ O ₅ -H] ⁻	161,04555	161,04469	-5,319	2
Sorbitol	[C ₆ H ₁₄ O ₆ -H] ⁻	181,07176	181,07104	3,431	0
Ácido hexilitacônico	[C ₁₁ H ₁₈ O ₄ -H] ⁻	213,11323	213,11285	-1,794	3
3-metil-8-hidroxi-4-decanoato	[C ₁₂ H ₂₂ O ₃ -H] ⁻	213,14962	213,14919	-2,007	2
Arabinofuranosiluracila	[C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆ -H] ⁻	243,06226	243,06217	-0,368	5
Ácido Palmítico	[C ₁₆ H ₃₂ O ₂ -H] ⁻	255,23295	255,23298	0,104	1
Ácido linoléico	[C ₁₈ H ₃₂ O ₂ -H] ⁻	279,23295	279,23318	0,811	3
Ácido oléico	[C ₁₈ H ₃₄ O ₂ -H] ⁻	281,24860	281,24885	0,876	2
Fisina	[C ₁₆ H ₁₂ O ₅ -H] ⁻	283,06120	283,06138	0,647	11
Ácido esteárico	[C ₁₈ H ₃₆ O ₂ -H] ⁻	283,26425	283,26446	0,728	1
N-frutossil-piroglutamato	[C ₁₁ H ₁₇ NO ₈ -H] ⁻	290,08814	290,08843	1,001	4
Ácido (10E,12Z)-9-oxooctadeca-10, 12-dienoico	[C ₁₈ H ₃₀ O ₃ -H] ⁻	293,21222	293,21272	1,712	4
Fumiquinazolina C	[C ₂₄ H ₂₁ N ₅ O ₄ -H] ⁻	442,15208	442,15287	1,793	17

m/zteo: O valor teórico da relação massa/carga (m/z); **m/zexp:** O valor experimental da relação m/z; **Error:** é calculado pela diferença em unidades de massa atômica (Da) entre o valor experimental (m/zexp) e o valor teórico (m/zteo); **DBE:** Double Bond Equivalent.

5.4 Diagramas de fases Pseudoternárias

O diagrama de fase pseudoternário do sistema em análise foi construído com o propósito de determinar a composição de três componentes-chave: uma fase aquosa, uma fase oleosa contendo miristato de isopropila, e uma fase surfactante/cosurfactante (proporção de 3:1). Esta abordagem visava à formulação de microemulsões, que são soluções transparentes, com estabilidade em temperatura ambiente. O diagrama de fase pseudoternário resultante é ilustrado na Figura 11, com a área identificada como "ME" representando a região propícia para a formação de microemulsões.

Figura 11. Diagrama de fase pseudoternário de óleo (miristato de isopropila), tensoativo (Tween 80/álcool iso-propílico, na proporção de 3:1) e fase aquosas. A área identificada como "ME" significa a zona de microemulsão.



Fonte: autores, (2024).

No contexto desta pesquisa, foram identificados domínios de microemulsões situados predominantemente na região superior do diagrama de fases, caracterizada por proporções de tensoativos superiores a 60%, juntamente com percentuais variando entre 10% e 40% para as fases oleosa e aquosa.

5.5 Caracterização da Formulação de microemulsão de *Rhizopus* sp

Neste estudo, foram investigados os parâmetros físicos essenciais para a caracterização de duas microemulsões incorporada por extrato de *Rhizopus* sp (MR) e sem a incorporação (MB) como pode ser observado na Tabela 5. As propriedades analisadas incluíram o tamanho médio de gotículas, o índice de polidispersividade e o potencial zeta, fornecendo *insights* valiosos sobre a qualidade e estabilidade dessas formulações.

Tabela 5. Valores de tamanho de partículas, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta das microemulsões incorporada por extrato de *Rhizopus* sp (MR) e sem a incorporação (MB).

Microemulsão	Tamanho de Gotículas (nm)	Índice de Polidispersividade	Potencial Zeta
MR	64,72 ± 1,495	0,352 ± 0,054	-11,343 ± 2,0136
MB	38,486 ± 0,7286	0,2963 ± 0,0318	-9,89 ± 0,734

Valores das médias das quintuplicata ± desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

A microemulsão MR revelou um tamanho médio de gotículas de 64,72 ± 1,495 nm, indicando a presença de partículas em uma faixa específica de tamanho. O índice de polidispersividade associado a esta microemulsão foi de 0,352 ± 0,054, sugerindo uma distribuição relativamente homogênea das gotículas. O potencial zeta negativo de -11,343 ± 2,0136 mV na microemulsão MR denota uma carga predominantemente negativa nas partículas, apresentando implicações significativas para a estabilidade coloidal do sistema.

Em contraste, a microemulsão MB exibiu um tamanho médio de gotículas ligeiramente menor, com 38,486 ± 0,7286 nm. O índice de polidispersividade associado a esta microemulsão foi de 0,2963 ± 0,0318, indicando uma distribuição de tamanhos ainda mais homogênea em comparação com a MR. O potencial zeta negativo de -9,89 ± 0,734 mV sugere uma carga elétrica predominantemente negativa nas partículas da microemulsão MB, similar à observada na MR.

5.6 Controle da qualidade das microemulsões desenvolvidas

As microemulsões, no decorrer dos 30 dias tanto sobre refrigeração com em temperatura ambiente, não apresentaram nenhuma mudança nas suas características macroscópicas, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Monitoramento da macroscópica da microemulsões obtidas incorporada por extrato de *Rhizopus* (MR) e sem a incorporação (MB) por 30 dias.

Microemulsão	Cor	Formação de fases	Turbidez	Precipitação
MB	Amarelo claro	ausência	ausência	ausência
MR	Laranja claro	ausência	ausência	ausência

Fonte: autores, (2024).

A microemulsão MB, caracterizada por uma tonalidade de cor amarelo claro, revelou a ausência de formação de fases, turbidez e precipitação. Esses resultados indicam uma estabilidade macroscópica notável, ressaltando a homogeneidade da formulação e a resistência a fenômenos como a separação de fases ou a formação de precipitados. A coloração amarelo-clara sugere uma estética visual agradável e coesa.

Por sua vez, a microemulsão MR, incorporada por extrato de *Rhizopus* sp, apresentou uma tonalidade de cor laranja claro, demonstrando uma modificação visual em relação à MB devido à presença do extrato. Da mesma forma que a MB, a MR exibiu ausência de formação de fases, turbidez e precipitação. A estabilidade macroscópica observada em MR, mesmo após a incorporação do extrato de *Rhizopus* sp, destaca a compatibilidade da formulação com a adição de componentes bioativos, mantendo a integridade estrutural.

Enquanto na análise realizada para os parâmetros pH, condutividade (expressa em $\mu\text{S}/\text{cm}$), e índice de refração (expresso em mg/L) monitorando no período de 15 dias (Tabela 7).

Tabela 7. Monitoramento quanto ao pH, condutividade e índice de refração da microemulsões obtidas incorporada por extrato de *Rhizopus* (MR) e sem a incorporação (MB) por 15 dias.

Tempo Avaliado (dias)	Microemulsão	pH (25°C)	Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}$ (25°C)	Índice de Refração mg/L
0	MB	8,17 \pm 0,01	7,94 \pm 0,01	1431 \pm 1,00
0	MR	8,16 \pm 0,01	6,57 \pm 0,0058	1441,7 \pm 1,53
2	MB	8,186667 \pm 0,006	7,2 \pm 0,1	1436,7 \pm 1,53
2	MR	8,17 \pm 0,01	6,57 \pm 0,015	1443 \pm 1,00
5	MB	8,21 \pm 0,01	7,11 \pm 0,01	1435,7 \pm 1,523
5	MR	8,216667 \pm 0,012	6,58 \pm 0,0058	1444,7 \pm 0,58
10	MB	8,243333 \pm 0,006	7,11 \pm 0,01	1436,7 \pm 0,58
10	MR	8,266667 \pm 0,006	6,58 \pm 0,01	1444 \pm 1,00
15	MB	8,283333 \pm 0,006	7,17 \pm 0,0153	1437,3 \pm 0,58
15	MR	8,266667 \pm 0,012	6,61 \pm 0,0153	1446 \pm 1,00

Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

O monitoramento realizado demonstrou que a microemulsão MB e MR revelou um pH com valores de 8,16 a 8,28 indicando uma leve alcalinidade. Enquanto a condutividade de MB ao longo dos 15 dias ficou entre 7,11 a 7,94 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sugere uma capacidade moderada de condução elétrica, sugerindo uma boa dispersão e interação entre as partículas, já MR apresentou 6,57 a 7,17 $\mu\text{S}/\text{cm}$ o que sugere uma possível influência do extrato de *Rhizopus* na composição iônica, mantendo, contudo, um nível moderado de condutividade.

O índice de refração de 1431 a 1444 mg/L evidencia a habilidade da MB e MR em desviar a luz, aspecto relevante para suas propriedades ópticas e estabilidade coloidal. E a variação mínima de MR em relação à MB, denota estabilidade óptica mesmo após a incorporação do extrato.

5.7 Quantificação Química de Fenóis e Flavonóides totais de extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp

O teor de compostos fenólicos totais encontrados para *Rhizopus* sp como observado na (Tabela 8), calculados através da equação de regressão $y = 0,0009x - 0,0681$,

com R2 de (0,9961). O teor de Flavonóide totais foi calculado através da equação de regressão $y = 0,028x - 0,0625$, com R2 de (0,9938).

Tabela 8. Teores de compostos fenólicos totais extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp após 24 h de tratamento.

Amostras Analisadas	Quantificação Química	
	fenólicos totais (mg EAG g ⁻¹)*	flavonoides totais (mg EQ g ⁻¹)*
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i> sp	436,5 ^a ± 11,59	116,7 ^a ± 0,1190
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	630,8 ^b ± 18,46	318,60 ^b ± 2,062
Microemulsão (Branco)	24,75 ^c ± 1,159	27,14 ^c ± 0,2062
Microemulsão da Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	969,8 ^d ± 8,167	656,7 ^d ± 5,189

*EAG = equivalente em ácido gálico. *EQ = equivalente em quercetina. Valores das médias das quintuplicata ± desvio padrão. Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo ANOVA Tukey's multiple comparisons test

Fonte: autores, (2024).

A análise das amostras, tanto para a quantificação de fenólicos totais quanto para flavonoides totais, revelou diferenças estatisticamente significantes. Na avaliação dos fenólicos totais, a Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp apresentou a maior concentração (969,8 mg EAG g⁻¹), seguida pelo Extrato Biomassa de *Rhizopus* sp (630,8 mg EAG g⁻¹). Em contraste, a Microemulsão (Branco) registrou a menor concentração (24,75 mg EAG g⁻¹), com o Extrato Extracelular de *Rhizopus* sp posicionado intermediariamente (436,5 mg EAG g⁻¹).

Da mesma forma, a quantificação de flavonoides totais demonstrou diferenças significativas entre as amostras. A Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp exibiu a maior quantidade (656,7 mg EQ g⁻¹), seguida pelo Extrato Biomassa de *Rhizopus* sp (318,60 mg EQ g⁻¹). Por outro lado, a Microemulsão (Branco) apresentou a menor concentração de flavonoides (27,14 mg EQ g⁻¹), com o Extrato Extracelular de *Rhizopus* sp exibindo valores intermediários (116,7 mg EQ g⁻¹).

5.8 Atividades Biológicas do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp

5.8.1 Atividade Antimicrobiana

Os resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), representando a menor concentração de substâncias necessárias para inibir o crescimento de diferentes tipos de bactérias testadas. Foram testadas várias substâncias, incluindo extratos de *Rhizopus* sp e uma microemulsão, em comparação com a Gentamicina, um antibiótico padrão, como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração inibitória mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp em diferentes culturas bacterianas após 24 h de tratamento.

Amostras Analisadas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i> sp	250 \pm 0,00	125 \pm 0,00	500 \pm 0,00	500 \pm 0,00
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	125 \pm 0,00	62,5 \pm 0,00	250 \pm 0,00	250 \pm 0,00
Microemulsão (Branco)	nd	nd	nd	nd
Microemulsão da Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	31,25 \pm 0,00	15,625 \pm 0,00	62,5 \pm 0,00	62,5 \pm 0,00
Gentamicina	8,0 \pm 0,00	2,0 \pm 0,00	16,0 \pm 0,00	16,0 \pm 0,00

CIM: concentração inibitória mínima; nd: não determinado. Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

Os extratos do *Rhizopus* foram capazes de inibir o crescimento bacteriano a concentrações consideravelmente maiores em comparação com a Gentamicina. Por exemplo, o extrato extracelular de *Rhizopus* sp obteve valores de CIM 250 $\mu\text{g/mL}$ contra *Escherichia coli* enquanto a Gentamicina exigiu 8,0 $\mu\text{g/mL}$. Para o *Staphylococcus aureus*, obteve CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ comparada aos 2,0 $\mu\text{g/mL}$ da Gentamicina. CIM mais elevadas ainda foram obtidas para *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella*, ambas com concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ quando comparada aos 16 $\mu\text{g/mL}$ da gentamicina.

Embora as concentrações do extrato de biomassa tenham apresentado um melhor desempenho, ainda sim as CIM foram bem superiores quando comparadas à gentamicina.

Para *Escherichia coli* o extrato de biomassa apresentou CIM de 125 µg/mL enquanto a Gentamicina exigiu 8,0 µg/mL; para *Staphylococcus aureus* o extrato de biomassa apresentou CIM de 62,5 µg/mL enquanto a Gentamicina exigiu 2,0 µg/mL e para *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* o extrato de biomassa apresentou CIM de 250 µg/mL enquanto a Gentamicina exigiu 16 µg/mL.

A Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp obteve valores que mais se aproximaram da gentamicina. Com CIM de 31,25 µg/mL contra *Escherichia coli*, enquanto a Gentamicina exigiu 8,0 µg/mL. Da mesma forma, em relação à *Staphylococcus aureus*, a Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp demonstrou uma CIM de 15,625 µg/mL, comparada aos 2,0 µg/mL da Gentamicina.

A Tabela 10 apresenta a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato extracelular, extrato da biomassa e microemulsão de *Rhizopus* e gentamicina em culturas de bactérias após 24 horas de tratamento.

Tabela 10. Concentração Bactericida Mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* em diferentes culturas de bactérias após 24 h de tratamento.

Amostras Analisadas	CBM (µg/mL)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i> sp	500 ± 0,00	250 ± 0,00	500 ± 0,00	500 ± 0,00
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	125 ± 0,00	62,5 ± 0,00	500 ± 0,00	500 ± 0,00
Microemulsão (Branco)	ni	ni	ni	ni
Microemulsão da Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	31,25 ± 0,00	15,625 ± 0,00	62,5 ± 0,00	62,5 ± 0,00
Gentamicina	8,0±0,00	2,0 ± 0,00	16,0 ± 0,00	16,0 ± 0,00

CBM: concentração bactericida mínima; ni: não inibição. Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

A microemulsão da biomassa de *Rhizopus* sp foi a amostra mais eficaz entre todas as testadas, apresentando as menores CBMs, especialmente contra *Escherichia coli* (31,25 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (15,625 µg/mL).

Os resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), representando a menor concentração de substâncias necessárias para inibir o crescimento de diferentes

tipos de leveduras testadas. Foram testados extratos de *Rhizopus* sp e uma microemulsão, em comparação com a Anfotericina B, um antibiótico padrão, como pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração inibitória mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp em diferentes culturas de leveduras após 24 h de tratamento.

Amostras Analisadas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i> sp	500 \pm 0,00	250 \pm 0,00	250 \pm 0,00
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	125 \pm 0,00	62,5 \pm 0,00	125 \pm 0,00
Microemulsão (Branco)	nd	nd	nd
Microemulsão da Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	62,5 \pm 0,00	7,81 \pm 0,00	15,63 \pm 0,00
Anfotericina B	32,0 \pm 0,00	16 \pm 0,00	16,0 \pm 0,00

CIM: concentração inibitória mínima; nd: não determinado. Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

Os resultados dos testes de CIM mostraram que frente levedura *C. albicans* a microemulsão da biomassa de *Rhizopus* foi mais eficaz CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, embora a Anfotericina B tenha demonstrado a maior eficácia, com uma CIM de 32 $\mu\text{g/mL}$.

No caso de *C. parapsilosis*, a microemulsão da biomassa de *Rhizopus* mostrou uma eficácia maior, com uma CIM de apenas 7,81 $\mu\text{g/mL}$, tendo resultado melhor que o da Anfotericina B, que teve uma CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$. Em relação a levedura *C. tropicalis*, a microemulsão da biomassa de *Rhizopus* apresentou uma CIM de 15,63 $\mu\text{g/mL}$, resultado melhor que a Anfotericina B, que foi de 16 $\mu\text{g/mL}$.

A microemulsão MB não demonstrou atividade inibitória (nd) em nenhuma das culturas de leveduras testadas, confirmando que a eficácia observada nas microemulsões contendo biomassa de *Rhizopus* foi devida aos componentes ativos presentes na biomassa.

A Tabela 12 apresenta a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato extracelular, extrato da biomassa e microemulsão de *Rhizopus* em culturas de leveduras após 24 horas de tratamento. As leveduras testadas com os resultados comparados ao padrão antifúngico, Anfotericina B.

Tabela 12. Concentração Fungicida mínima do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* em diferentes culturas de leveduras após 24 h de tratamento.

Amostras Analisadas	CFM ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i>	500 \pm 0,00	250 \pm 0,00	250 \pm 0,00
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i>	250 \pm 0,00	62,5 \pm 0,00	250 \pm 0,00
Microemulsão (Branco)	ni	ni	ni
Microemulsão da Biomassa de <i>Rhizopus</i>	125 \pm 0,00	15,63 \pm 0,00	15,63 \pm 0,00
Anfotericina B	32,0 \pm 0,00	16 \pm 0,00	16,0 \pm 0,00

CFM: concentração fungicida mínima; ni: não inibição. Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

Para a levedura *C. albicans*, a microemulsão da biomassa de *Rhizopus* exibiu a CFM de 125 $\mu\text{g/mL}$, destacando-se como uma opção eficaz, embora a Anfotericina B tenha demonstrado uma CFM de apenas 32 $\mu\text{g/mL}$, confirmando sua superioridade como padrão de comparação. No caso de *C. parapsilosis*, a microemulsão da biomassa de *Rhizopus* demonstrou uma CFM impressionantemente baixa de 15,63 $\mu\text{g/mL}$, muito próxima da CFM da Anfotericina B, que foi de 16 $\mu\text{g/mL}$. Isso sugere que a microemulsão possui um potencial considerável como agente antifúngico contra *C. parapsilosis*.

Para *C. tropicalis* a microemulsão da biomassa de *Rhizopus* destacou-se novamente, com uma CFM de 15,63 $\mu\text{g/mL}$, igualando a eficácia da Anfotericina B, que também apresentou uma CFM de 16 $\mu\text{g/mL}$. A microemulsão MB não demonstrou atividade inibitória (nd) em nenhuma das culturas de leveduras testadas.

5.8.2 Atividade Antioxidante pela técnica DPPH e ABTS

Os resultados da atividade antioxidante do extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp foi determinado pelo teste DPPH e ABTS comparando com o antioxidante sintético (trolox) (tabela 13).

Tabela 13. Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp pelo método do DPPH e ABTS.

Amostras Analisadas	Atividade antioxidante ($\mu\text{M ET/g}$)*	
	DPPH	ABTS
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i> sp	1036 ^a \pm 8,167	913,1 ^a \pm 49,38
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	12171 ^b \pm 71,28	12058 ^b \pm 825,4
Microemulsão (Branco)	204,1 ^c \pm 40,85	466,9 ^c \pm 0,363
Microemulsão da Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	103400 ^d \pm 1544	87272 ^d \pm 6362

*ET = equivalente do Trolox. Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo ANOVA Tukey's multiple comparisons test

Fonte: autores, (2024).

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada por meio de dois ensaios distintos, DPPH e ABTS, revelando diferenças altamente significativas entre elas. No ensaio DPPH, a Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp destacou-se com a mais elevada atividade antioxidante (103.400 $\mu\text{M ET/g}$), seguida pelo Extrato Biomassa de *Rhizopus* sp (12.171 $\mu\text{M ET/g}$). Em contraste, a Microemulsão (Branco) exibiu uma atividade consideravelmente inferior (204,1 $\mu\text{M ET/g}$), enquanto o Extrato Extracelular de *Rhizopus* sp mostrou uma atividade intermediária (1.036 $\mu\text{M ET/g}$). No ensaio ABTS, os resultados também evidenciaram diferenças estatisticamente significativas.

Novamente, a Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp apresentou a maior atividade antioxidante (87.272 $\mu\text{M ET/g}$), seguida pelo Extrato Biomassa de *Rhizopus* sp (12.058 $\mu\text{M ET/g}$). A Microemulsão (Branco) registrou uma atividade antioxidante significativamente inferior (466,9 $\mu\text{M ET/g}$), enquanto o Extrato Extracelular de *Rhizopus* sp demonstrou uma atividade intermediária (913,1 $\mu\text{M ET/g}$). Essas variações são de relevância substancial, refletindo o potencial antioxidante das amostras e sua capacidade de neutralizar radicais livres, com implicações relevantes para aplicações em áreas relacionadas à saúde e à indústria.

Na Tabela 14, apresentam-se os resultados da atividade antioxidante expressa como a concentração efetiva de 50% (EC50) no extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp, utilizando os métodos do DPPH e ABTS, com comparação ao Trolox como antioxidante de referência.

Tabela 14. Atividade antioxidante da concentração efetiva de 50% (EC50) extrato extracelular, extrato da Biomassa e microemulsão de *Rhizopus* sp pelo método do DPPH e ABTS.

Amostras Analisadas	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	DPPH	ABTS
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i> sp	250,30 ^a \pm 4,072	512 ^a \pm 17,13
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	25,00 ^b \pm 2,1	129,1 ^b \pm 4,201
Microemulsão (Branco)	2448 ^c \pm 254,1	2442 ^c \pm 108,30
Microemulsão da Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	11,37 ^d \pm 0,3611	7,388 ^d \pm 0,6424
Trolox	10,132 ^d \pm 0,00	4,053 ^d \pm 0,00

Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo ANOVA Tukey's multiple comparisons test

Fonte: autores, (2024).

Os resultados destacaram diferenças significativas na atividade antioxidante entre as amostras analisadas. O DPPH, os resultados destacaram diferenças significativas na atividade antioxidante entre as amostras analisadas. O Extrato Biomassa de *Rhizopus* sp (EC50 de 25,00 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou notável eficácia na neutralização de radicais livres, com uma EC50 consideravelmente baixa. A Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp (EC50 de 11,37 $\mu\text{g/mL}$) também exibiu eficácia notável e, notavelmente, foi estatisticamente equivalente ao Trolox (EC50 de 10,132 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, o Extrato Extracelular de *Rhizopus* sp (EC50 de 250,30 $\mu\text{g/mL}$) e a Microemulsão (Branco) (EC50 de 2448 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram EC50 mais elevadas, indicando menor eficácia na neutralização de radicais livres.

No ensaio ABTS, foram observadas diferenças notáveis na atividade antioxidante entre as amostras. A Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp (EC50 de 7,388 $\mu\text{g/mL}$) destacou-se com eficácia significativa na neutralização de radicais livres, exibindo uma EC50 notavelmente baixa, estatisticamente equivalente ao Trolox (EC50 de 4,053 $\mu\text{g/mL}$). O Extrato Biomassa de *Rhizopus* sp (EC50 de 129,1 $\mu\text{g/mL}$) também demonstrou eficácia. O Extrato Extracelular de *Rhizopus* sp (EC50 de 512 $\mu\text{g/mL}$) apresentou atividade antioxidante notável. Em contraste, a Microemulsão (Branco) (EC50 de 2442 $\mu\text{g/mL}$) revelou uma EC50 mais elevada, indicando menor eficácia na neutralização de radicais livres.

5.8.3 Atividade Antitumoral

Os experimentos (Tabela 15) com o Extrato Biomassa de *Rhizopus* sp revelaram um efeito citotóxico dependente da concentração nas células HeLa com os valores de CI_{50} de 50,92 $\mu\text{g/mL}$ entretanto para as células VERO e PC-3 os valores de IC_{50} foram inferiores a 20 $\mu\text{g/ml}$, e sem efeito para as B16-F10. O Extrato Extracelular de *Rhizopus* sp revelaram um efeito citotóxico dependente da concentração nas células VERO com os valores de CI_{50} de 283,92 $\mu\text{g/mL}$ entretanto para as células HeLa e PC-3 os valores de CI_{50} foram superiores a 1000 $\mu\text{g/ml}$, e sem efeito para as B16-F10.

A Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp revelou IC_{50} de 6,34 $\mu\text{g/ml}$ para as células HeLa, CI_{50} inferiores a 2 $\mu\text{g/ml}$ para as células VERO e B6-F10, e inferior a 20 $\mu\text{g/ml}$ para PC-3. O branco da microemulsão revelou CI_{50} de 6,24 $\mu\text{g/ml}$ para as células HeLa, CI_{50} inferiores a 2 $\mu\text{g/ml}$ para as células VERO e B6-F10, e inferior a 20 $\mu\text{g/ml}$ para PC-3.

Tabela 15 – Viabilidade celular pelo método de MTT nas linhagens celulares Vero, HeLa, PC-3 e B16-F10. Dados expressos em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$), após 24 h de incubação.

Extrato	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	Vero	HeLa	PC3	B16-F10
Extrato Extracelular de <i>Rhizopus</i> sp	283,92 \pm 17,20	>1000	>1000	na
Extrato Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp	<20	50,92 \pm 14,32	<20	>1000
Microemulsão (Branco)	<2	6,24 \pm 0,92	<20	<2
Microemulsão da Biomassa <i>Rhizopus</i> sp	<2	6,34 \pm 0,54	<20	<2

na: não avaliado; Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

Mediante tais achados (Tabela 16) optamos por seguir em triplicata testando apenas o extrato biomassa com as células HeLa e B16-F10 dentre as células do experimento inicial, considerando que houve indisponibilidade das células VERO e PC-3 para seguimento. Acrescentamos mais 2 linhagens celulares para o experimento que foram as células SiHa e Caco-2. Conforme pode ser observado na tabela 14, o ensaio MTT revelou um efeito citotóxico dependente da concentração nas células HeLa com os valores de CI_{50} de 56,22 $\mu\text{g/mL}$. Para as células SiHa, Caco-2 e B16-F10 o CI_{50} assumidos foram superiores a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 16) (Figura 12, 13).

Tabela 16 – Viabilidade celular pelo método de MTT nas linhagens celulares SiHa, HeLa, Caco-2 e B16-F10. Dados expressos em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$), após 24 h de incubação.

Extrato	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	SiHa	HeLa	Caco-2	B16-F10
Biomassa de <i>Rhizopus</i>	>1000	56,22 \pm 13,67	>1000	>1000

Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão.

Fonte: autores, (2024).

Figura 12 – Gráfico de porcentagem de morte celular em células Vero do extrato de *Rhizopus* sp caldo em 24 horas de incubação.

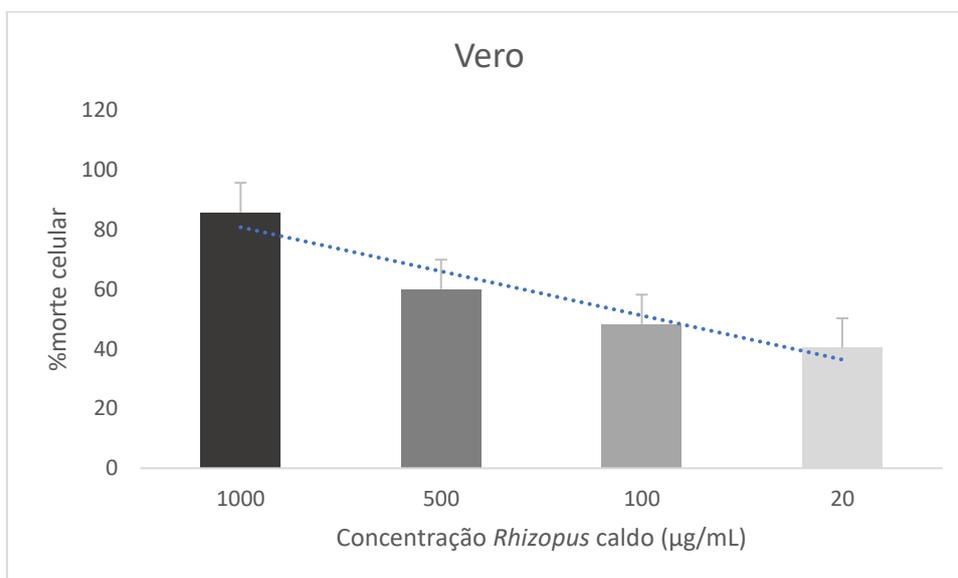
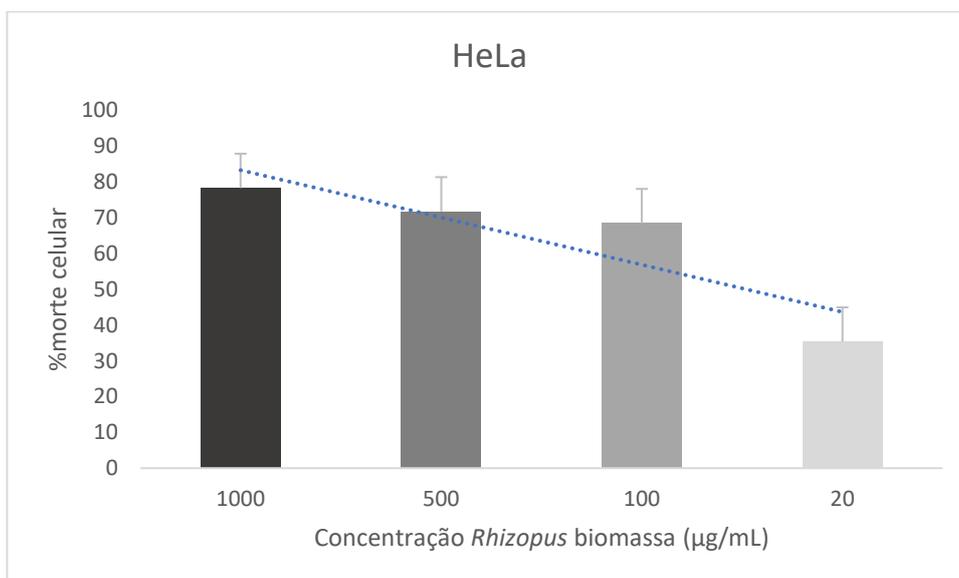


Figura 13 – Gráfico de porcentagem de morte celular em células HeLa do extrato de *Rhizopus* sp biomassa em 24 horas de incubação.



6. DISCUSSÃO

Extrato de *Rhizopus sp.* já descrito na literatura (Ragavendran et al 2019; Pilevneli, et al, 2021; El-Zawawy, et al 2023), entretanto, não foram encontrados até o momento microemulsão incorporada com extrato de fungo *Rhizopus sp.*, assim, resolvemos verificar se esse mesmo gênero isolado do ar ao ser incorporado a uma microemulsão poderia produzir ou potencializar atividade biológica. A partir desta hipótese foi verificado se a Microemulsão incorporada com extrato de fungo foi capaz de apresentar atividade antimicrobiana (bactérias e fungos), atividade antioxidante e anticancerígena.

Inicialmente foi realizado a identificação macroscópica e microscópica de *Rhizopus sp.* isolado do ar sendo comprovados sua identificação por PCR, após comprovarmos estar diante de uma cepa de *Rhizopus sp.* preparou-se o extrato de fungo extracelular (caldo) e intracelular (biomassa micelial) e então foi realizado a Análise Química do Extrato de Fungo por Espectrometria de Massa Orbitrap (Orbitrap-MS).

Foram identificados treze compostos químicos (tabela 3) sendo estes: 1,6-Anidro- β -glicose, Sorbitol, ácido hexilitacônico, 3-metil-8-hidroxi-4-decanoato, Arabinofuranosiluracila, Ácido Palmítico, Ácido linoléico, Ácido oléico, Fisina, Ácido esteárico, N-frutossil-piroglutamato, Ácido (10E,12Z)-9-oxooctadeca-10,12-dienoico e Fumiquinazolina C.

Yamamoto et al (2023) verificaram que o ácido linoléico melhorou a hiperglicemia pós-prandial por desaceleração de esvaziamento gástrico pela promoção da secreção GLP-1. Enquanto Viladomiu, Hontecillas, Hassaganya-Riera (2016) verificaram que ácido linoleico possuem atividade anti-inflamatória, anticarcinogênica, antidiabéticas e anti-hipertensivas em modelo *in vivo*.

O composto químico fumiquinazolina C foi identificado em extratos de *Aspergillus niger*, sendo observado atividade antimicrobiana e citotóxicas *in vitro* (Abdel-Razek et al., 2018). Em pesquisa realizada por Gauthier et al (2012) foram verificados também a presença de fumiquinazolina C em extrato de *A. fumigatus* sendo tóxico para a linhagem de células pulmonares humanas A549.

Varli et al (2023) encontram no extrato de extratos *Phoma sp.* ácidos graxos, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico. Observando que realizando tratamento com os isolados do extrato de fungo frente a câncer de pulmão conseguiram suprimir a expressão de PD-L1 induzida por benzo[a]pireno (um ligante AhR) para inibir a atividade de múltiplos pontos de verificação imunológicos, verificando ainda um efeito inibitório na

expressão de STAT3 e efeito moderado na atividade de NF- κ B. Esses resultados sugerem que os ácidos extraídos podem exercer fortes efeitos imunoterapêuticos.

Pesquisa realizada por Gonçalves et al (2021a) encontraram N-frutossil piroglutamato em extrato de *A. affinis* e Gonçalves et al (2021b) verificaram que extratos de micélios de *Aspergillus affinis* inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, incluindo cepas multirresistentes e foram citotóxicos para células Vero. Observaram ainda que extratos de *Penicillium lusitanum* e *Trichoderma aestuarinum* inibiram o crescimento de cepas clínicas de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Realizamos uma busca na Literatura e encontramos algumas pesquisas recentes com extrato de *Rhizopus* sp. Em trabalho desenvolvido por Ragavendran et al (2019) com o extrato de micélio *Rhizopus* sp. foram testados quanto à atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* apresentando CL 50 de 56,062 e CL 90 de 210,908 $\mu\text{g/mL}$ e as larvas tratadas com metabólitos de micélio fúngico isolados exibiram taxa de mortalidade da seguinte ordem: *Aspergillus* sp. > *Mucor* sp. > *Rhizopus* sp. > *A. parasites* > *A. flavus* > *A. niger* > *Penicillium* sp.

Pilevneli et al, (2021) investiram a composição química metabólitos secundários em extrato metanólico bruto *Rhizopus oryzae* identificando três derivados de ácido micofenólico, juntamente com dois dímeros de nafto- γ -pirona conhecidos, asperpirona A (4) e dianidroaurasperona C (5). Todos os compostos isolados foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana contra quatro microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e revelaram atividades moderadas a fracas com valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 62,5 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

El-Zawawy et al (2023) prepararam o extrato de *Rhizopus oryzae* apresentando maior teor de a L-tirosina (caracterizado e purificado) exibiu fortes atividades antibacterianas e anti-biofilme contra bactérias multirresistentes (*P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*) apresentando CIM de 6 a 20 $\mu\text{g/mL}$, causou uma forte redução na formação de biofilme e interrompeu o biofilme pré-formado e não apresentou nenhuma citotoxicidade.

O número de infecções invasivas por espécies de *Candida não albicans* aumentou (Pfaller et al., 2005), e a *Candida parapsilosis* se torna relevante neste cenário pela sua capacidade de formar biofilmes em cateteres venosos centrais e outros dispositivos

clínicos utilizados na assistência médica, figurando como ameaça potencial para pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos (Harrington et al., 2017; Paramythiotou et al., 2014) e a *Candida tropicalis* tem exibido uma preocupante resistência antifúngica nos últimos anos (Dos Santos; Ishida, 2023). O extrato de *Rhizopus* sp se apresenta como excelente potencial opção para o tratamento de *Candida não albicans*, tendo em vista que atualmente estão disponíveis apenas três classes principais de medicamentos para tratamento: polienos, equinocandinas e azóis, o que representa um número limitado de opções de medicamentos antifúngicos, destacando-se a anfotericina B mais utilizado clinicamente há mais de 50 anos (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021; Denning; Hope, 2010).

Diante dos resultados relatados na literatura acima para composto químicos encontrados nesta pesquisa e os extratos *Rhizopus* sp. resolvemos analisar a atividade biológica. Como mencionado acima e na tabela 3 que encontra-se a composição química do extrato de *Rhizopus sp.* que também foram encontrados em outros gêneros e espécies de fungos, porém não verificados na cepa de *Rhizopus sp.*, aliado a isso e a sua solubilização não eficiente em solventes orgânicos decidiu-se produzir uma formulação (microemulsão).

Visto que a literatura mencionada acima já descreve atividade biológicas para algumas moléculas identificadas questionou-se se a mesma atividade seria encontrada no extrato em estudo. Logo após a identificação química realizou-se a construção do diagrama pseudoternário (figura 8), no qual foi selecionada a região em que melhor teria-se uma microemulsão, e a mesma foi incorporada do extrato de *Rhizopus sp* realizando assim a verificação das atividades biológicas propostas.

Foi realizada caracterização química da formulação construída conforme tabela 5, sendo analisados tamanho das partículas para comprovarmos suas dimensões manométricas. De acordo com Soares (2011), microemulsões possuem tamanhos que variam entre 10 a 100nm, o que foi verificado para MR nesta pesquisa.

Quanto ao índice de polidispersividade (IPD), verificou-se que o MR apresentou índice igual a $0,352 \pm 0,054$, indicando que a microemulsão tem caráter mais homogêneo, uma vez que o IPD é uma medida de homogeneidade da dispersão em relação ao diâmetro e valores próximos de zero o que indica homogeneidade da dispersão, enquanto valores que se aproximam de 1 indicam alta heterogeneidade (Resende, 2013).

Outro teste realizado para sua caracterização foi o potencial zeta, que pode ter um valor positivo ou negativo. O valor medido fornece uma indicação a respeito da

estabilidade da dispersão. As formulações com valores superiores a +20 mV e inferiores a -20 mV são considerados estáveis (Rocha, 2019).

O valor de $-11,343 \pm 2,0136$ de potencial zeta obtido para MR pode ser explicado a partir da análise do tensoativo utilizado. O tensoativo Tween 80 é classificado como não-iônico e, por esse motivo, o potencial zeta das microemulsão são valores mais próximos de zero. Apesar disso, essas formulações possuem a capacidade de formar camadas adsorvidas ao redor das gotículas, de modo que a aproximação de suas superfícies e a agregação para o estado coagulado é inibida (Rocha, 2019)

Após verificarmos que estávamos diante de uma microemulsão realizamos o teste de estabilidade que foi realizado no intervalo de 15 dias em que analisamos características macroscópicas, pH, condutividade e índice de refração. As características macroscópicas para MR e MB conforme tabela 6, ao longo de 15 dias não verificamos formação de fases, turbidez e precipitação. MR manteve-se estável após a incorporação ao extrato extracelular, o que sugere que pode ser viável em aplicações farmacêuticas. Para o parâmetro pH verificamos ao longo de 15 dias que não houve qualquer alteração quando comparado com a MB ficando evidente que não houve alteração na acidez ou alcalinidade da formulação.

Na condutividade houve uma pequena redução o que pode ser facilmente explicado pela composição química do extrato que podem influenciar no teste. Porém a condutividade de MR encontra-se aceitável pois indica que a formulação apresenta uma dispersão e interação eficiente. Com o resultado observado para o índice de refração demonstra que ao realizar a incorporação do extrato a estabilidade ótica foi preservada assim como as propriedades físicas.

Ao finalizamos a primeira etapa que foi a caracterização da formulação realizamos a quantificação de fenóis e flavonoides totais dos extratos e das formulações (tabela 8). A MR produzida do extrato intracelular de *Rhizopus* sp. apresentou maior concentração de fenólicos totais (969,8 mg EAG/g) demonstrando que a formulação foi capaz de concentrar de maneira efetiva os fenólicos existentes no extrato. O mesmo foi observado para a quantificação de flavonoides totais em que MR (656,7 mg EAG/g) apresentou maior quantificação comprovando que a incorporação tornou MR uma matriz eficaz.

Essa análise nos sugere que as formulações poderiam ser aplicadas na indústria nutricional ou farmacêutica pois a presença destas classes químicas indica uma fonte potencial de atividade antioxidante, antimicrobiana dentre outras. Nos garantindo seu uso em produtos funcionais e terapêuticos.

Ao percebermos que MR funciona como uma matriz eficaz iniciamos os testes antimicrobianos, antioxidante e anticancerígeno pois a composição química do extrato e os resultados da quantificação de fenóis e flavonoides demonstrou-se traduzir em uma eficiente atividade biológica.

Os testes antimicrobianos conforme tabela 9, indicam que a incorporação foi eficiente pois MR apresentou valores de CIM entre 15,625 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para as bactérias estudadas enquanto o extrato intracelular usado para incorporação 250 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e a gentamicina usado como controle variou entre 2 a 16 $\mu\text{g/mL}$. A gentamicina por se tratar de um composto isolado que já possui uma concentração otimizada não invalida a eficiência comprovado de MR, pois se trata de uma formulação que foi preparada de um extrato bruto. Sendo que a eficiência de MR se comprova pela influência de um complexo químico, que atua em uma ação sinérgica aumentando a eficácia antimicrobiana na matriz que fica aumentada comparada com extrato extra e intracelular.

Ao realizarmos o CBM verificamos o mesmo comportamento encontrado no CIM para MR com concentrações 15,625 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ demonstrando não só a inibição da bactéria, mas a morte celular.

Os testes antifúngicos conforme tabela 11 e 12, demonstram potencial similar verificado para as bactérias testadas, porém MR apresentou concentração de 7,81 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e quando comparado a anfotericina B, MR foi mais eficiente contra *C. parapsiloses* mesmo não sendo um composto isolado. O CIM dos extratos e MB apresentaram valores entre 62,5 e 500 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o CFM para MR 15,63 a 125 $\mu\text{g/mL}$.

Pesquisas realizadas por Holetz et al (2002), Sartoratto et al (2004) e Wayne et al (2020) demonstram que valores entre 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentam forte ou ótima atividade, enquanto que 600 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ moderada e acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ inativo. O que demonstra que tanto MR como os tratos apresentaram ótima atividade antimicrobiana.

Para os testes antioxidantes (tabela 13 e 14), MR foi mais eficiente, apresentando EC50 de 11,37 $\mu\text{g/mL}$ para estabilização do radical DPPH e 7,388 $\mu\text{g/mL}$ para ABTS sendo igual estatisticamente ao trolox um antioxidante sintético, demonstrando sua eficiência que pode ser comprovado pelo alto teor de fenóis e flavonoides totais encontrado, demonstrando uma grande eficiência na neutralização de radicais livres sendo um bom doador de elétrons. O extrato bruto e MB apresentaram EC50 superiores demonstrando a importância da utilização de formulações para melhorar ou potencializar

os compostos bioativos presentes no extrato. Ao realizarmos o teste de equivalente da amostra frente ao trolox observa-se que MR foi superior aos extratos e MB testados podendo ser uma formulação promissora frente aos antioxidantes utilizados tanto na indústria de alimentos como na farmacêutica

Ao verificarmos que tanto MR como os extratos de *Rhizopus sp* apresentam resultados promissores para as atividades biológicas testadas, principalmente para atividade antioxidante resolvemos verificar sua resposta frente atividade anticancerígena. Diante desta possibilidade testamos células como Caco-2 (adenocarcinoma de colo), HeLa e SiHa (carcinoma cervical), PC-3 (adenocarcinoma prostático), B16-F10 (câncer de pele) e célula não cancerígena (Vero).

O Extrato Biomassa de *Rhizopus sp* apresentou CI_{50} de 50,92 $\mu\text{g/mL}$ quando testado frente a HeLa, porém verificamos que o resultado foi potencializado quando testado com MR (6,24 $\mu\text{g/mL}$), enquanto para PC-3 verificamos valores menores que 20 $\mu\text{g/mL}$ para Extrato Biomassa de *Rhizopus sp* e MR. A B16-F10 apresentou concentração menor que 2 $\mu\text{g/mL}$ quando tratado com MR.

Estudo semelhante foi feito por Zang et al (2021) ao avaliaram extrato de *Rhizopus oryzae* ao no tratamento de células HeLa apresentando um efeito citotóxico e dependente da dose com CI_{50} de 0,54 $\mu\text{g/mL}$, o mesmo foi verificado por Sumi, Mitsuo e Yatagai (2021) ao tratarem HeLa com extrato de *Rhizopus oligosporus* observaram atividade trombolítica com liberação de t-PA, liberando 17,7 vezes mais que o controle, fazendo com que as células ficassem totalmente necróticas.

Pesquisa com doze extratos de fungos realizada por Ahamed e Murugan (2019) observaram que o extrato de *Rhizopus sp.* frente a várias linhagens cancerígenas (HEp2 e AS49) com CI_{50} de 161,0 e 185,0 $\mu\text{g/mL}$ e foram tóxicos também para célula Vero.

Enquanto o extrato de *Rhizopus stolonifer* foram isolados compostos químicos que não apresentaram citotoxicidade frente a célula 3T3 (fibroblastos de camundongo) porém não mostraram ser ativos quando tratados por HeLa e PC3 (Bano et al 2016).

Pesquisa de Choudhary et al. (2011) com *Rhizopus stolonifer* testaram um metabólito isolado, tratando células de HeLa e não verificaram atividade anticancerígena. Leverrier et al (2010) produziram extratos de *Rhizopus arrhizus* tratando linhagens de câncer KB (carcinoma epidermóide oral) e HCT-116 (carcinoma do cólon humano) não apresentando nenhuma atividade anticancerígena.

Diante do exposto afirmamos que o extrato de *Rhizopus* se apresentou promissor e que se realizou uma pesquisa inovadora ao incorporamos o extrato de *Rhizopus* a uma

formulação (microemulsão) nunca descrita na literatura até o momento para este fungo com as atividades biológicas testadas.

6 CONCLUSÃO

- O extrato de *Rhizopus* sp, isolado do ambiente maranhense, revelou uma diversidade de metabólitos durante a análise química. Destacam-se cinco ácidos graxos, como ácido palmítico, ácido linoléico, ácido oléico e ácido esteárico, além de açúcares e derivados.
- A caracterização da microemulsão destacou sua estabilidade ao longo do tempo, com tamanho de partícula na faixa nanométrica. A análise macroscópica indicou ausência de fases, turbidez e precipitação, ressaltando a compatibilidade da formulação com a adição de componentes bioativos.
- A análise do pH, condutividade e índice de refração revelou que a microemulsão manteve sua estabilidade óptica e características físicas após a incorporação do extrato de *Rhizopus* sp. O potencial zeta, indicativo de estabilidade da dispersão, permaneceu em níveis moderados.
- A incorporação da microemulsão ao extrato de *Rhizopus* sp preservou e concentrou os metabólitos presentes, evidenciando a eficiência do processo de formulação. A presença de fenólicos totais e flavonoides totais foi quantificada, sugerindo a manutenção da riqueza desses compostos bioativos.
- Os testes antimicrobianos apontam para promissora capacidade dos extratos de *Rhizopus* sp, uma vez que o extrato agrega uma diversidade de compostos, em diferentes concentrações. A eficácia em concentrações significativamente maiores do que a Gentamicina, deve ser atribuída por não se tratar composto único/molécula isolada.
- Os testes que avaliaram a ação antifúngica revelaram ainda forte/ótima atividade contra diferentes espécies de cândida, otimizada na formulação da microemulsão.
- Os resultados dos testes de atividade antioxidante demonstraram que a Microemulsão da Biomassa de *Rhizopus* sp apresentou a mais elevada atividade antioxidante nos ensaios DPPH e ABTS, comparável ao antioxidante de referência Trolox. A presença da microemulsão foi crucial na eficácia dos extratos do *Rhizopus* sp, destacando a importância da formulação na otimização das propriedades bioativas.
- O extrato biomassa é uma possível fonte de fármaco para adjuvância no tratamento do câncer de colo do útero.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O extrato obtido possui potencial para uma diversidade de aplicações farmacêuticas que incluem ação anti-oxidante, antibacteriana, antifúngica e antitumoral na adjuvância do tratamento do câncer de colo do útero. A microemulsão é uma formulação viável e potencializadora dos ativos do extrato em suas aplicações antioxidantes e antimicrobiana, entretanto a microemulsão não se mostrou veículo eficaz do ativo para aplicação antitumoral. Assim este trabalho aponta para necessidade de avaliação de outros veículos que favoreçam a entrega dos metabólitos obtidos do extrato de *Rhizopus* em testes de cultura celular. Esta pesquisa ainda suscita necessidade de avaliação do prazo de validade da microemulsão obtida.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK AS, HAMED A, FRESE M, SEWALD N, SHAABAN M. Penicisteroid C: New polyoxygenated steroid produced by co-culturing of *Streptomyces piomogenus* with *Aspergillus niger*. **Steroids**. 2018;138:21-25. doi:10.1016/j.steroids.2018.06.005,
- ABE, A. *et al.* Rdna ITS Sequence of *rhizopus oryzae*: Its application to classification and identification of lactic acid producers. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 8, 2003.
- ABE, A. *et al.* *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. **Mycologia**, v. 99, n. 5, 2007.
- ABE, A.; ASANO, K.; SONE, T. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 7, 2010.
- ABU-RUSTUM, N. R.; YASHAR, C. M. Cervical Cancer - NCCN. **National Comprehensive Cancer Network**, v. Version 1., 2023.
- AHAMED, F.; MURUGAN, M. Isolation and Characterization of Marine Endophytic Fungi from Seaweeds, and Bioactivity of their Crude extracts. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 3, 2019.
- ÁLVAREZ-ORTIZ, P. *et al.* *Purshia plicata* triggers and regulates proteins related to apoptosis in HeLa cancer cells. **Plants**, v. 10, n. 12, 2021.
- AN, Z. **Handbook of industrial mycology**. [s.l: s.n.], 2004.
- APPRILL, A. The Role of Symbioses in the Adaptation and Stress Responses of Marine Organisms. **Annual Review of Marine Science**, 2020.
- AVERILL, C.; TURNER, B. L.; FINZI, A. C. Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. **Nature**, v. 505, n. 7484, 2014.
- BAGCHI, R. *et al.* Pathogens and insect herbivores drive rainforest plant diversity and composition. **Nature**, v. 506, n. 7486, 2014.
- BAHRAM, M. *et al.* Structure and function of the global topsoil microbiome. **Nature**, v. 560, n. 7717, 2018.
- BAHRAM, M.; NETHERWAY, T. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, 2022.
- BALASUBRAMANIAM, S. D. *et al.* Key molecular events in cervical cancer development. **Medicina (Lithuania)**, 2019.
- BALTZ, R. H. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 3–4, 2019.

BANO, S. *et al.* New anti-inflammatory metabolites by microbial transformation of medrysone. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.

BARBOSA, F. *et al.* Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2020.

BASILE, A. *et al.* Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite Parietin. **Int. J. Mol. Sci**, v. 16, p. 7861–7875, 2015.

BECKER, J. *et al.* GKK1032A 2, a secondary metabolite from *Penicillium* sp. IBWF-029-96, inhibits conidial germination in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 2, 2012.

BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. **Resistance to Antifungal Drugs. Infectious Disease Clinics of North America**, 2021.

BHATLA, N. *et al.* Cancer of the cervix uteri: 2021 update. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 155, n. S1, 2021a.

BHATLA, N. *et al.* Implications of the revised cervical cancer FIGO staging system. **Indian Journal of Medical Research**, 2021b.

BHATLA, N. *et al.* Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, 2019.

BIRCH, M. *et al.* Polar lipids of *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* and *A. terreus*. **Medical Mycology**, v. 36, n. 3, 1998

BO, G. Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. S3, 2000.

BOMFIN, Mariana Klein. **Microemulsão como estratégia de liberação de bioativos em formulações tópicas: revisão bibliográfica. 2021.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2021.

BOONME, P. *et al.* Microemulsion and Microemulsion-Based Gels for Topical Antifungal Therapy with Phytochemicals. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, 2016.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes - Nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008.

CACERES, I. *et al.* Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. **Toxins**, 2020.

CALDWELL, G. A.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. Fungal lipopeptide mating pheromones: a model system for the study of protein prenylation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, 1995.

- CALLENDER, S. P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017.
- CANCER, I. A. FOR R. ON. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. **Press Release**, 2018.
- CANNAC, M.; NIKOLIC, J.; BENAROCH, P. Cancer Immunotherapies Based on Genetically Engineered Macrophages. **Cancer Immunology Research**, 2022.
- CHANDA, A. *et al.* A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 46, 2009.
- CHARGARI, C. et al. Radiotherapy of cervical cancer. **Cancer Radiother.** 2022 Feb-Apr;26(1-2):298-308. doi: 10.1016/j.canrad.2021.11.009. Epub 2021 Dec 23. PMID: 34955418.
- CHELIMO, C. *et al.* Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **Journal of Infection**, 2013.
- CHEN, L. *et al.* Differential soil fungus accumulation and density dependence of trees in a subtropical forest. **Science**, v. 366, n. 6461, 2019.
- CHESSON, H. W. *et al.* The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 41, n. 11, 2014.
- CHIEWPATTANAKUL, P. *et al.* Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 12, 2010.
- CHOI, J. *et al.* Fungal Secretome Database: Integrated platform for annotation of fungal secretomes. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- CHOI, S. *et al.* HPV and Cervical Cancer: A Review of Epidemiology and Screening Uptake in the UK. **Pathogens**, 2023.
- CHONG, S. G. *et al.* Nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics studies on non-organic soybeans versus organic soybeans (*Glycine max*), and their fermentation by *Rhizopus oligosporus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 103, n. 6, 2023.
- CHOUDHARY, M. I. *et al.* Biotransformation of (20S)-20-hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one by four filamentous fungi. **Steroids**, v. 76, n. 12, 2011.
- CLEMMENSEN, K. E. *et al.* Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. **Science**, v. 340, n. 6127, 2013.
- CLEVINGER, K. D. *et al.* A scalable platform to identify fungal secondary metabolites and their gene clusters. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 8, 2017.
- COLEINE, C. *et al.* Beyond the extremes: Rocks as ultimate refuge for fungi in drylands. **Mycologia**, 2021.

CORRIGENDUM. to “Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri” [Int J Gynecol Obstet 145(2019) 129–135] . **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 147, n. 2, 2019

CORZO-LEÓN, D. E.; UEHLING, J. K.; BALLOU, E. R. Rhizopus arrhizus. **Trends in Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 985–987, set. 2023.

CROSBIE, E. J. *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889–899, set. 2013.

CRUZ, J. F. DELA *et al.* Viscum album var hot water extract mediates anti-cancer effects through G1 phase cell cycle arrest in SK-Hep1 human hepatocarcinoma cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 15, 2015.

DASTIDAR, G. *et al.* Is neo-adjuvant chemotherapy a better option for management of cervical cancer patients of rural India? **Indian Journal of Cancer**, v. 53, n. 1, 2016.

DATTA, N. R. *et al.* Concurrent chemoradiotherapy vs. radiotherapy alone in locally advanced cervix cancer: A systematic review and meta-analysis. **Gynecologic Oncology**, 2017.

DE LA SALUD, O. P. Synthesis of evidence and recommendations: guidelines for cervical cancer screening, detection, and treatment. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 47, 2023.

DE MARTEL, C. *et al.* Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, 2017.

DE VISSER, K. E.; JOYCE, J. A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell**, 2023.

DEMAIN, A. L.; MARTENS, E. Production of valuable compounds by molds and yeasts. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 4, 2017.

DENG, Y. *et al.* Correlation: Between Autochthonous Microbial Diversity and Volatile Metabolites During the Fermentation of Nongxiang Daqu. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. **Therapy for fungal diseases: Opportunities and priorities. Trends in Microbiology**, 2010.

DING, Y.-S. *et al.* Apoptotic effect of physcion isolated from marine fungus *Microsporum* sp. in PC3 human prostate cancer cells. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 21, n. 1, p. 22, 2 dez. 2018.

DOLATABADI, S. *et al.* Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. **Fungal Diversity**, v. 64, n. 1, 2014b.

DOLATABADI, S. *et al.* Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*). **Mycoses**, v. 57, n. s3, 2014a.

- DOS SANTOS, M. M.; ISHIDA, K. **We need to talk about *Candida tropicalis*: Virulence factors and survival mechanisms.** *Medical Mycology*, 2023.
- DU, L.; LI, S. Compartmentalized biosynthesis of fungal natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, 2021.
- DUGUÉ, P. A. *et al.* Risk of cervical cancer in women with autoimmune diseases, in relation with their use of immunosuppressants and screening: Population-based cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 6, 2015.
- DURÁN, P. *et al.* Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote Arabidopsis Survival. **Cell**, v. 175, n. 4, 2018.
- DUTTA, S. *et al.* Image-Guided Radiotherapy and -Brachytherapy for Cervical Cancer. **Frontiers in Oncology**, 2015.
- EL HABBASH, A. I. *et al.* In vitro assessment of anti-proliferative effect induced by α -mangostin from *Cratogeomys arborescens* on HeLa cells. **PeerJ**, v. 2017, n. 7, 2017.
- EL-SAYED, A. A. *et al.* Cytotoxic effects of newly synthesized heterocyclic candidates containing nicotinonitrile and pyrazole moieties on hepatocellular and cervical carcinomas. **Molecules**, v. 24, n. 10, 2019.
- El-Zawawy, N. A., Ali, S. S., & Nouh, H. S. (2023). Exploring the potential of *Rhizopus oryzae* AUMC14899 as a novel endophytic fungus for the production of L-tyrosine and its biomedical applications. **Microbial cell factories**, 22(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02041-1>.
- EVIDENTE, A.; KISS, R. Editorial: Bioactive Fungal Metabolites. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 2, 2018.
- FAY, N.; PANTÉ, N. **Nuclear entry of DNA viruses.** *Frontiers in Microbiology*, 2015.
- FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: an overview. *International Journal of Cancer*, New York, Apr. 2021. DOI 10.1002/ijc.33588.
- FERNANDEZ, C. W.; KENNEDY, P. G. Revisiting the “Gadgil effect”: Do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils? **New Phytologist**, v. 209, n. 4, 2016.
- FREEDMAN, R. *et al.* A structural determinant of mycophenolic acid resistance in eukaryotic inosine 5'-monophosphate dehydrogenases. **Protein Science**, v. 29, n. 3, 2020.
- GAUTHIER T, WANG X, SIFUENTES DOS SANTOS J, *et al.* Trypacidin, a spore-borne toxin from *Aspergillus fumigatus*, is cytotoxic to lung cells. **PLoS One**. 2012;7(2):e29906. doi:10.1371/journal.pone.0029906.
- GIRARD, V. *et al.* Secretomes: The fungal strike force. **Proteomics**, 2013.
- GONÇALVES M.F.M., PAÇO A., ESCADA L.F., ALBUQUERQUE M.S.F., PINTO C.A., SARAIVA J., DUARTE A.S., ROCHA-SANTOS T.A.P., ESTEVES A.C., ALVES

- A. Unveiling biological activities of marine fungi: The effect of sea salt. **Appl. Sci.** 2021a;11:6008. doi: 10.3390/app11136008
- GONÇALVES, M. F. M., HILÁRIO, S., TACÃO, M., VAN DE PEER, Y., ALVES, A., & ESTEVES, A. C. (2021b). Genome and Metabolome MS-Based Mining of a Marine Strain of *Aspergillus affinis*. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, 7(12), 1091. <https://doi.org/10.3390/jof7121091>
- GRAHAM, S. V. Human papillomavirus: Gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiology**, 2010.
- GRAHAM, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. **Clinical Science**, 2017.
- GRAU, J. F. *et al.* Advances in immunotherapy in cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, 2023.
- GREMMELS, H. *et al.* Oleic acid increases mitochondrial reactive oxygen species production and decreases endothelial nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 751, 2015.
- GROSSART, H. P. *et al.* Fungi in aquatic ecosystems. **Nature Reviews Microbiology**, 2019.
- GRYGANSKYI, A. P. *et al.* Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 6, 2018.
- HAGHIGHAT, N. *et al.* The effects of conjugated linoleic acid supplementation on liver function enzymes and malondialdehyde in adults: A GRADE-assessed systematic review and dose-response meta-analysis. **Pharmacological Research**, 2022.
- HAN, J. *et al.* Dimeric hexylitaconic acids from the marine-derived fungus *Aspergillus welwitschiae* CUGBMF180262. **Natural Product Research**, p. 1–8, 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, 2011.
- HARKENRIDER, M. M. *et al.* **Image-based brachytherapy for the treatment of cervical cancer. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 2015.
- HASSANE, A. M. A. *et al.* In Vitro and In Silico Antioxidant Efficiency of Bio-Potent Secondary Metabolites From Different Taxa of Black Seed-Producing Plants and Their Derived Mycoendophytes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.
- HAUSMAN, D. M. What is cancer? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, 2019.
- HE, X. *et al.* Biotransformation of dihydrocapsaicin by human intestinal fungi and the inhibitory effects of metabolites against LSD1. **Heliyon**, v. 8, n. 12, 2022.

HESS, J. *et al.* Rapid divergence of genome architectures following the origin of an ectomycorrhizal symbiosis in the genus *Amanita*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 11, 2018.

HÖHN, A. K. *et al.* 2020 WHO Classification of Female Genital Tumors. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 81, n. 10, 2021.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, 2002.

HORVATH, C. A. *et al.* Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: An overview. **Virology Journal**, 2010.

HOU, X. M. *et al.* Penimethavone A, a flavone from a gorgonian-derived fungus *Penicillium chrysogenum*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 20, 2016.

HÜTTEL, W. Echinocandins: structural diversity, biosynthesis, and development of antimycotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2021.

IBRAHIM, S. R. M. *et al.* Natural Products of the Fungal Genus *Humicola*: Diversity, Biological Activity, and Industrial Importance. **Current Microbiology**, 2021.

invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, 1999.

JADHAV, K. *et al.* Applications of Microemulsion Based Drug Delivery System. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 3, 2006.

JANUSZ, G. *et al.* Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, 2017.

JELLINEK, J. Nanoalloys: Tuning properties and characteristics through size and composition. **Faraday Discussions**, v. 138, 2008.

JENDOUBI-FERCHICHI, M. *et al.* Phylogeny and classification of human papillomavirus (HPV)16 and HPV18 variants based on E6 and L1 genes in Tunisian women with cervical lesions. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 12, 2018.

JEONG, W. *et al.* The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019.

JIANG, L. *et al.* Effects of *Pediococcus acidilactici* and *Rhizopus Oryzae* on microbiota and metabolomic profiling in fermented dry-cure mutton sausages. **Food Chemistry**, v. 403, 2023.

JIANG, L. *et al.* Major Metabolites and Microbial Community of Fermented Black Glutinous Rice Wine With Different Starters. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

JIANG, Y. et al. Study on Secondary Metabolites of Endophytic Fungus, *Aspergillus fumigatus*, from *Crocus sativus* L. Guided byUHPLC-HRMS/MS-Based Molecular Network. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2022, 2022a.

JIANG, Y. et al. Study on Secondary Metabolites of Endophytic Fungus, *Aspergillus fumigatus*, from *Crocus sativus* L. Guided byUHPLC-HRMS/MS-Based Molecular Network. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2022, 2022b.

JOHNSON, C. A. *et al.* Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. **Seminars in Oncology Nursing**, 2019.

JONAS, R.; SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology. **Anais**.2004.

JUMIATI, R.; CHANDRA, B.; ASRA, D. R. Drug Discovery of Griseofulvin : A Review. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 9, n. 4, 2021.

KAANICHE ID, F. et al. Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia*. sp isolated from **Rauwolfia macrophylla**. 2019.

KAKOTKIN, V. V. *et al.* Prevention Strategies and Early Diagnosis of Cervical Cancer: Current State and Prospects. **Diagnostics**, 2023.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2016.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, 2019.

KHALID, S. *et al.* NRPS-Derived Isoquinolines and Lipopeptides Mediate Antagonism between Plant Pathogenic Fungi and Bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 1, 2018.

KHAN, R. et al. Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: A review. **Journal of Fungi**, 2021.

KHAZAEI, S. *et al.* In vitro antiproliferative and apoptosis inducing effect of *Allium atroviolaceum* bulb extract on breast, cervical, and liver cancer cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JAN, 2017.

KIRNBAUER, R. *et al.* Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, 1992.

KISTLER, H. C.; BROZ, K. Cellular compartmentalization of secondary metabolism. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

KUMBHAJ, P.; SHARMA, R.; BHATNAGAR, A. R. Quality of life and sexual functioning in cervical cancer survivors after surgery and radiotherapy. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 3, 2013.

KUO J, CHANG CF, CHI WC. Isolation of endophytic fungi with antimicrobial activity from medicinal plant *Zanthoxylum simulans* Hance [published correction appears in **Folia Microbiol (Praha)**. 2021 Oct;66(5):873. doi: 10.1007/s12223-021-00872-2.

LANGE, L.; BARRETT, K.; MEYER, A. S. New method for identifying fungal kingdom enzyme hotspots from genome sequences. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 2021.

LEDERBERG, J. Mechanism of action of penicillin. **Journal of bacteriology**, v. 73, n. 1, 1957.

LEE, D. P. S. *et al.* Regular Consumption of Biovalorized Okara-Containing Biscuit Improves Circulating Short-Chain Fatty Acids and Fecal Bile Acids Concentrations by Modulating the Gut Microbiome: A Randomized Controlled Crossover Trial. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 67, n. 13, 2023.

LEISSO, R.; RUDELL, D.; MAZZOLA, M. Targeted metabolic profiling indicates apple rootstock genotype-specific differences in primary and secondary metabolite production and validate quantitative contribution from vegetative growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

LEVERRIER, A. *et al.* Rearranged diterpenoids from the biotransformation of ent-trachyloban-18- oic acid by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, 2010.

LI YANYUN AND XU, C. Human Papillomavirus-Related Cancers. Em: CAI QILIANG AND YUAN, Z. AND L. K. (Ed.). **Infectious Agents Associated Cancers: Epidemiology and Molecular Biology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 23–34.

LI, S. F. *et al.* Metabolomic analyses revealed multifaceted effects of hexanal on *Aspergillus flavus* growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 9, 2021.

LIM, F. Y. *et al.* Fungal isocyanide synthases and xanthocillin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. **mBio**, v. 9, n. 3, 2018.

LIU, J.; PANDYA, P.; AFSHAR, S. Therapeutic advances in oncology. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

LIU, J.; PENG, Y.; WEI, W. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. **Trends in Cell Biology**, 2022.

LIU, X. Y.; HUANG, H.; ZHENG, R. Y. Molecular phylogenetic relationships within *Rhizopus* based on combined analyses of ITS rDNA and pyrG gene sequences. **Sydowia**, v. 59, n. 2, 2007.

LIU, Z. C. *et al.* Multiple sexual partners as a potential independent risk factor for cervical cancer: A meta-analysis of epidemiological studies. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 9, 2015.

LOPEZ, M. S. *et al.* Cervical cancer prevention and treatment in Latin America. **Journal of Surgical Oncology**, 2017.

LOUIE, K. S. *et al.* Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 7, 2009.

M.A.A., S. A revision of the genus *Rhizopus* I. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. **Studies in mycology**, v. 25, 1984.

MAGOTRA, A. *et al.* Epigenetic modifier induced enhancement of fumiquinazoline C production in *Aspergillus fumigatus* (GA-L7): an endophytic fungus from *Grewia asiatica* L. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 43, 17 dez. 2017.

MANINI, I.; MONTOMOLI, E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. **Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunita**, v. 30, n. 4, 2018.

MARSOLA SJ, JORGE LF, MENIQUETI AB, et al. Endophytic fungi of *Brunfelsia uniflora*: isolation, cryopreservation, and determination of enzymatic and antioxidant activity. **World J Microbiol Biotechnol**. 2022;38(6):94. Published 2022 Apr 20. doi:10.1007/s11274-022-03278-5.

MARTÍN-REYES, F. et al. Oleic acid regulates the circadian rhythm of adipose tissue in obesity. **Pharmacological Research**, v. 187, 2023.

MAYADEV, J. S. *et al.* Global challenges of radiotherapy for the treatment of locally advanced cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, 2022.

MAZUMDER, K. et al. Identification of bioactive metabolites and evaluation of in vitro anti-inflammatory and in vivo antinociceptive and antiarthritic activities of endophyte fungi isolated from *Elaeocarpus floribundus* blume. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 273, 2021. la

MESHER, D. *et al.* Type-specific HPV prevalence in invasive cervical cancer in the UK prior to national HPV immunisation programme: Baseline for monitoring the effects of immunisation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, n. 2, 2015.

MIRIYALA, R. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery in cervical cancer: Past, present and future. **International Journal of Gynecological Cancer**, 2022.

MOSQUERA WG, CRIADO LY, GUERRA BE. Antimicrobial activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Mammea americana* (Calophyllaceae) and *Moringa oleifera* (Moringaceae). Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales *Mammea americana* (Calophyllaceae) y *Moringa oleifera* (Moringaceae). **Biomedica**. 2020;40(1):55-71. Published 2020 Mar 1. doi:10.7705/biomedica.4644.

MURRU, E. *et al.* Conjugated Linoleic Acid and Brain Metabolism: A Possible Anti-Neuroinflammatory Role Mediated by PPAR α Activation. **Frontiers in Pharmacology**, 2021.

NAGALAKHSMI, S.; JOTHI, R. V.; SUBRAHMANYAM, A. V. Zygambella Phosphophila Gen. & Sp. Nov. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 2, p. 198–200, 2008.

NETHERWAY, T. *et al.* Biotic interactions with mycorrhizal systems as extended nutrient acquisition strategies shaping forest soil communities and functions. **Basic and Applied Ecology**, v. 50, 2021.

NIELSEN, K. F. *et al.* Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2009.

OPAS, O. P.-A. DE S. **Brasil lança estratégia nacional para prevenção e eliminação do câncer do colo do útero**. 2023 Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/23-3-2023-brasil-lanca-estrategia-nacional-para-prevencao-e-eliminacao-do-cancer-do-colo>

OSKIERA, M.; SZCZECHE, M.; BARTOSZEWSKI, G. Molecular Identification Of Trichoderma Strains Collected To Develop Plant Growth-Promoting And Biocontrol Agents. **Journal of Horticultural Research**, v. 23, n. 1, 2015.

OXFORD, A. E.; RAISTRICK, H.; SIMONART, P. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C(17)H(17)O(6)Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx. **The Biochemical journal**, v. 33, n. 2, 1939.

PAPANICOLAOU, G; TRAUT, H. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, n.42, p.193-206. 1941.

PARAMYTHIOTOU, E. *et al.* Invasive fungal infections in the icu: How to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, 2014.

PARK, S. E. *et al.* Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters. **Food Chemistry**, v. 274, 2019.

PFALLER, M. A. *et al.* Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study: A 6.5-year analysis of susceptibilities of candida and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, 2005.

PETCA, A. *et al.* Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 6, 2020.

PETROVIC, V. *et al.* Anti-cancer potential of homemade fresh garlic extract is related to increased endoplasmic reticulum stress. **Nutrients**, v. 10, n. 4, 2018.

PIERCE, E. C. *et al.* Bacterial–fungal interactions revealed by genome-wide analysis of bacterial mutant fitness. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 1, 2021.

PILEVNELI, A. D., EBADA, S. S., KAŞKATEPE, B., & KONUKLUGIL, B. (2021). Penicacids H-J, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Rhizopus oryzae*. **RSC advances**, 11(55), 34938–34944. <https://doi.org/10.1039/d1ra07196c>.

- PIMPLE, S. A.; MISHRA, G. A. Global strategies for cervical cancer prevention and screening. **Minerva Ginecologica**, 2019.
- PLETT, J. M.; MARTIN, F. Reconsidering mutualistic plant-fungal interactions through the lens of effector biology. **Current Opinion in Plant Biology**, 2015.
- POLJŠAK, N.; KOČEVAR GLAVAČ, N. Vegetable Butters and Oils as Therapeutically and Cosmetically Active Ingredients for Dermal Use: A Review of Clinical Studies. **Frontiers in Pharmacology**, 2022.
- POUNDS, J. A. *et al.* Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature**, 2006.
- PRESCOTT, T. A. K. *et al.* Fungal Drug Discovery for Chronic Disease: History, New Discoveries and New Approaches. **Biomolecules**, 2023.
- QI, F. *et al.* Microbial production of the plant-derived fungicide physcion. **Metabolic Engineering**, v. 74, p. 130–138, 1 nov. 2022.
- QUIN, M. B.; FLYNN, C. M.; SCHMIDT-DANNERT, C. Traversing the fungal terpenome. **Natural Product Reports**, 2014.
- RAGAVENDRAN, C., MANIGANDAN, V., KAMARAJ, C., BALASUBRAMANI, G., PRAKASH, J. S., PERUMAL, P., & NATARAJAN, D. (2019). Larvicidal, Histopathological, Antibacterial Activity of Indigenous Fungus *Penicillium* sp. Against *Aedes aegypti* L and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) and Its Acetylcholinesterase Inhibition and Toxicity Assessment of Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in microbiology**, 10, 427. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00427>.
- RESENDE, D. I. S. P. *et al.* Chemistry of the fumiquinazolines and structurally related alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 1, p. 7–34, 2019.
- REVERBERI, M. *et al.* Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010.
- RIBEIRO, A. A. *et al.* HPV infection and cervical neoplasia: Associated risk factors. **Infectious Agents and Cancer**, v. 10, n. 1, 2015.
- RICHARDS, R. M. *et al.* Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, 2006.
- RILEY-SALDAÑA, C. A. *et al.* Do Colletotrichum gloeosporioides and Rhizopus stolonifer induce alkaloidal and antifungal responses in Annona muricata seedlings? **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 78, n. 1–2, 2023.
- RODRÍGUEZ-CARUNCHIO, L. *et al.* HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: A distinct type of cervical cancer with poor prognosis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 1, 2015.

ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. C. L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, 2011.

ROTMAN, M. *et al.* A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in Stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a gynecologic oncology group study. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 65, n. 1, 2006.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. 1ª ed. Fortaleza – CE: Comunicado técnico 127, **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007. ISSN 1679-6535.

RUGGIERO, M. A. *et al.* A higher level classification of all living organisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

RUIZ, Á. M. *et al.* Proximity of first sexual intercourse to menarche and risk of high-grade cervical disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 12, 2012.

RYBCZYŃSKA-TKACZYK, K. *et al.* Natural Bacterial and Fungal Peptides as a Promising Treatment to Defeat Lung Cancer Cells. **Molecules**, 2023.

SABEENA, S. *et al.* Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, 2017.

SAIRI, A. M. M. *et al.* Cytotoxicity and Anticancer Activity of *Donkioporiella mellea* on MRC5 (Normal Human Lung) and A549 (Human Lung Carcinoma) Cells Lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

SALDAN, N. C. *et al.* Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. **Food Chemistry**, v. 241, 2018.

SALEH, M. *et al.* Cervical cancer: 2018 revised international federation of Gynecology and Obstetrics staging system and the role of imaging. **American Journal of Roentgenology**, 2020.

SANO, M. *et al.* Itaconic acid derivatives: structure, function, biosynthesis, and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 9041–9051, 1 nov. 2020.

SANTUCCI, C. *et al.* Progress in cancer mortality, incidence, and survival: A global overview. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 29, n. 5, 2020.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, 2004.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, Foams, Suspensions, and Aerosols: Microscience and Applications, 2nd Edition**. [s.l: s.n.].

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Natural Product Reports**, 2014.

SEDLIS, A. *et al.* A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A gynecologic oncology group study. **Gynecologic Oncology**, v. 73, n. 2, 1999.

SEDLIS, A. *et al.* A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A gynecologic oncology group study. **Gynecologic Oncology**, v. 73, n. 2, 1999.

SHI, T. *et al.* Harzianumones A and B: Two hydroxyanthraquinones from the coral-derived fungus: *Trichoderma harzianum*. **RSC Advances**, v. 8, n. 49, 2018.

SHIMADA, M. *et al.* The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

SHRIVASTAVA, S. *et al.* Cisplatin chemoradiotherapy vs radiotherapy in FIGO stage IIIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix a randomized clinical trial. **JAMA Oncology**, v. 4, n. 4, 2018.

SIEGFRIED, G. *et al.* Proprotein convertases: Key players in inflammation-related malignancies and metastasis. **Cancer Letters**, 2020.

SONG, D. *et al.* Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). **Oncology Letters**, 2015.

SONG, F. Q. *et al.* Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *Inonotus obliquus*. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2013.

SUMI, H.; MITSUO, T.; YATAGAI, C. Anti-cancer Activity of Tempeh – Spermine Can Induce the Necrosis of HeLa Cells. **Res Pract Thromb Haemost**, 2021.

SUN, R. T. *et al.* Root Endophytic Fungi Regulate Changes in Sugar and Medicinal Compositions of *Polygonum cuspidatum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, Feb. 2021. DOI 10.3322/caac.21660.

SZYCHOWSKI, K. A. *et al.* Biological and anticancer properties of *Inonotus obliquus* extracts. **Process Biochemistry**, v. 73, 2018.

TARTARO, G. *et al.* Microemulsion microstructure(s): A tutorial review. **Nanomaterials**, 2020.

TEDERSOO, L.; BAHRAM, M.; ZOBEL, M. How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. **Science**, v. 367, n. 6480, 2020.

TELES AM, PONTES LPP, GUIMARÃES SJA, *et al.* Marine-Derived *Penicillium purpurogenum* Reduces Tumor Size and Ameliorates Inflammation in an Erlich Mice Model. **Mar Drugs**. 2020;18(11):541. Published 2020 Oct 29. doi:10.3390/md18110541.

TELES, Amanda Mara. **Caracterização de metabólitos e atividade citotóxica do extrato de *Penicillium purpurogenum* de ambiente marinho em modelo de câncer de mama in vitro e in vivo.** 2020. 149 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2020.

TSUKAMOTO, S. et al. Hexylitaconic acid: A new inhibitor of p53-HDM2 interaction isolated from a marine-derived fungus, *Arthrinium* sp. 2005.

TSUKAMOTO, S. *et al.* Hexylitaconic acid: A new inhibitor of p53-HDM2 interaction isolated from a marine-derived fungus, *Arthrinium* sp. 2005.

TU, Q. Q. *et al.* Palmitic acid induces autophagy in hepatocytes via JNK2 activation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 4, 2014.

UMEMURA, M. *et al.* Characterization of the biosynthetic gene cluster for the ribosomally synthesized cyclic peptide ustiloxin B in *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 68, 2014.

VÁGVÖLGYI, C. et al. Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 86, n. 2, 2004.

VALENZUELA-LOPEZ, N. *et al.* Coelomycetous fungi in the clinical setting: Morphological convergence and cryptic diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, 2017.

VAN DER SPEK, A. *et al.* Circulating metabolites modulated by diet are associated with depression. **Molecular Psychiatry**, 2023.

VARLI, M., NGO, M. T., KIM, S. M., TAŞ, İ., ZHOU, R., GAMAGE, C. D. B., PULAT, S., PARK, S. Y., SESAL, N. C., HUR, J. S., KANG, K. B., & KIM, H. (2023). A fatty acid-rich fraction of an endolichenic fungus *Phoma* sp. suppresses immune checkpoint markers via AhR/ARNT and ESR1. **Heliyon**, 9(9), e19185.

VENUTI, A. *et al.* Papillomavirus E5: The smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, 2011.

VESCO, K. K. *et al.* Risk factors and other epidemiologic considerations for cervical cancer screening: A narrative review for the U.S. preventive services task force. **Annals of Internal Medicine**, 2011.

VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, 2016.

WAGNER, L. et al. A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 44, 2020.

- WALBOOMERS, J. M. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of
WALTHER, G. *et al.* DNA barcoding in Mucorales: An inventory of biodiversity.
Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, v. 30, 2013.
- WALL, J. A. *et al.* Preinvasive disease of the cervix. Em: **DiSaia and Creasman
Clinical Gynecologic Oncology**. [s.l: s.n.],2023.
- WALTHER, G. *et al.* DNA barcoding in Mucorales: An inventory of biodiversity.
Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, v. 30, 2013.
- WALTHER, G.; WAGNER, L.; KURZAI, O. Outbreaks of Mucorales and the Species
Involved. **Mycopathologia**, 2020.
- WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. Virus-like particles for the prevention of human
papillomavirus-associated malignancies. **Expert Review of Vaccines**, 2013.
- WANG, Z. J. *et al.* Neuroprotective effects of stearic acid against toxicity of
oxygen/glucose deprivation or glutamate on rat cortical or hippocampal slices. **Acta
Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 2, 2006.
- WANG, Z. J. *et al.* Stearic acid protects primary cultured cortical neurons against
oxidative stress. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 3, 2007.
- WAYNE, P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed.
CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. **Clsi
M100 Ed30:2020**, 2020.
- WEDEL, S. *et al.* Oxidized linoleic acid metabolites maintain mechanical and thermal
hypersensitivity during sub-chronic inflammatory pain. **Biochemical Pharmacology**, v.
198, 2022.
- WHELAN, J.; FRITSCHKE, K. Linoleic acid. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 3, 2013.
- WHITE, E. A.; MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. High-risk human papillomavirus E7
proteins target PTPN14 for degradation. **mBio**, v. 7, n. 5, 2016.
- WIJESEKARA, I. *et al.* Physcion from marine-derived fungus *Microsporium* sp.
induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. **Microbiological Research**,
v. 169, n. 4, p. 255–261, 1 abr. 2014.
- WILLIAMS, V. M. *et al.* HPV-DNA integration and carcinogenesis: Putative roles for
inflammation and oxidative stress. **Future Virology**, 2011.
- WONG, K. L. *et al.* Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in
rat cortical astrocytes. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 6, 2014.
- WOODS, N. *et al.* Natural Vaccine Adjuvants and Immunopotentiators Derived From
Plants, Fungi, Marine Organisms, and Insects. Em: **Immunopotentiators in Modern
Vaccines: Second Edition**. [s.l: s.n.],2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cervical Cancer**. Disponível em:
https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab_1

WRIGHT, J. D. *et al.* Prognostic Performance of the 2018 International Federation of Gynecology and Obstetrics Cervical Cancer Staging Guidelines. **Obstetrics and Gynecology**, v. 134, n. 1, 2019.

XIONG, Z. *et al.* An overview of the bioactivity of monacolin K / lovastatin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, 2019.

YAMAGATA, K. *et al.* Oleic acid and oleoylethanolamide decrease interferon- γ -induced expression of PD-L1 and induce apoptosis in human lung carcinoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 903, 2021.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Oral administration of linoleic acid immediately before glucose load ameliorates postprandial hyperglycemia. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023.

YAMASHITA S, SEKITANI Y, URITA K, MIYASHITA K, KINOSHITA M. Antioxidative Activities of Plants and Fungi Used as Herbal Medicines. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**. 2023;69(1):76-79. doi:10.3177/jnsv.69.76

YAO, D. *et al.* Microbial Community Succession and Metabolite Changes During Fermentation of BS Sufu, the Fermented Black Soybean Curd by *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, and *Actinomucor elegans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

YUAN, Y. *et al.* HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. **Cancer Letters**, 2021.

YUAN, Y. *et al.* HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. **Cancer Letters**, 2021.

YUN, C. S.; MOTOYAMA, T.; OSADA, H. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

ZAVERI, A.; EDWARDS, J.; ROCHFORT, S. Production of Primary Metabolites by *Rhizopus stolonifer*, Causal Agent of Almond Hull Rot Disease. **Molecules**, v. 27, n. 21, 2022.

ZHANG, N. *et al.* Ethyl acetate subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa* L.) exert anti-cancer properties in vitro and in vivo through G2/M and S Phase arrest and apoptosis. **Journal of Cancer**, 2021.

ZHANG, X.-Y. *et al.* Production, Biosynthesis, and Commercial Applications of Fatty Acids From Oleaginous Fungi. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 19 maio 2022.

ZHAO, C. *et al.* Effects of Jiuqu inoculating *Rhizopus oryzae* Q303 and *Saccharomyces cerevisiae* on chemical components and microbiota during black glutinous rice wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 385, 2023.

ZHAO, E. M. *et al.* Light-based control of metabolic flux through assembly of synthetic organelles. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 6, 2019.

ZHAO, H. *et al.* High-yield oleaginous fungi and high-value microbial lipid resources from Mucoromycota. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 4, p. 1196–1206, 13 dez. 2021.

ZHENG, R. Y. et al. A monograph of *Rhizopus*. **Sydowia**, v. 59, n. 2, 2007.

ZHENG, R. Y.; CHEN, G. Q. *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* var. nov. **Mycotaxon**, v. 69, 1998.

ZHOU, D. J. *et al.* Effects of oleic acid on SP-B expression and release in A549 cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 18, 2015.

ANEXO A



30/11/2023 870230105211
08:25

29409162312272861

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 025107 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: ageufma.cprp@ufma.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/11/2023 às 08:25, Petição 870230105211

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACOLÓGICA DE MICROEMULSÃO COM EXTRATO DE *Rhizopus* sp. E SUA OBTENÇÃO

Resumo: A presente patente descreve uma inovação farmacológica notável, consistindo em formulações de microemulsões contendo extrato de *Rhizopus* sp rico em metabólitos secundários, reconhecido por suas notáveis atividades biológicas. Essas formulações são concebidas com o objetivo de proporcionar aplicações terapêuticas eficazes, visando aprimorar a solubilidade e biodisponibilidade do extrato de *Rhizopus* sp. Cada formulação foi meticulosamente otimizada quanto à concentração, estabilidade e características químicas, culminando em um sistema de entrega seguro e eficiente. Esta inovação oferece uma abordagem pioneira para terapias biológicas, aproveitando as propriedades naturais do extrato de *Rhizopus* sp em um veículo microemulsionado. Tal avanço abre caminho para sua aplicação potencialmente ampla e eficaz em diversos campos da medicina e da farmacologia. Ao superar desafios relacionados à solubilidade e biodisponibilidade, esta inovação destaca-se como uma solução de vanguarda, promovendo uma administração mais eficaz e segura de compostos terapêuticos. Este avanço representa não apenas uma contribuição significativa para o desenvolvimento de terapias baseadas em fungos, mas também abre novas possibilidades para a aplicação clínica e farmacêutica dessas formulações microemulsionadas.

Figura a publicar: 01

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 30/11/2023 às 08:25, Petição 870230105211

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5**Nome:** MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO**CPF:** 04492900349**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av dos Portugueses, 1966 Bacanga**Cidade:** São Luís**Estado:** MA**CEP:** 65080-805**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 327 29520**Fax:****Email:** m.desterro.soares@gmail.com**Inventor 2 de 5****Nome:** GEUSA FELIPA DE BARROS BEZERRA**CPF:** 05496772320**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av dos Portugueses, 1966 Bacanga**Cidade:** São Luís**Estado:** MA**CEP:** 65080-805**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 330 45979**Fax:****Email:** geusabezerra@gmail.com**Inventor 3 de 5**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
30/11/2023 às 08:25, Petição 870230105211

Nome: AMANDA MARA TELES

CPF: 00884911373

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua Jardim Aurora, número: 69. Bairro Aurora.

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65064-140

País: BRASIL

Telefone: (98) 981 288635

Fax:

Email: damarateles@hotmail.com

Inventor 4 de 5

Nome: KATIA REGINA ASSUNÇÃO BORGES

CPF: 68496060349

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Virgílio Domingues no 328 – Condomínio Una dos Moraes apt
306 – São Francisco

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65076-340

País: BRASIL

Telefone: (98) 989 923128

Fax:

Email: kareborges@gmail.com

Inventor 5 de 5

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
30/11/2023 às 08:25, Petição 870230105211

Nome: VALÉRIA MARIA SOUSA LEITÃO

CPF: 79500684349

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Médico

Endereço: Rua do Farol, Número: 21 Ed. Monte Fuji, Apto: 203. Bairro São Marcos.

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65077-450

País: BRASIL

Telefone: (98) 992 311001

Fax:

Email: valeriamsleitao@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO (14).pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES (16).pdf
Desenho	FIGURAS (2).pdf
Resumo	RESUMO (15).pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento (3).pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
30/11/2023 às 08:25, Petição 870230105211

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: 91276-1

Acesso:

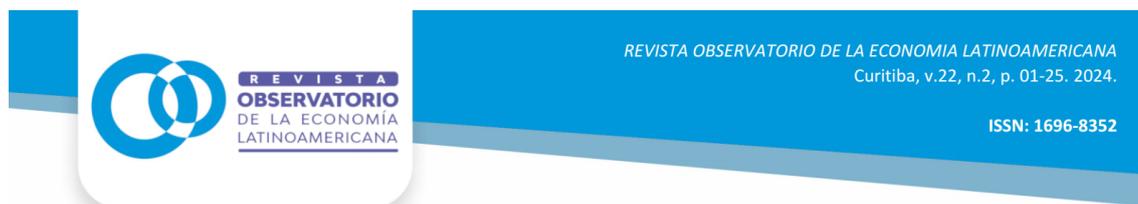
Data da Autorização de Acesso: 29/09/2023

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 30/11/2023 às 08:25, Petição 870230105211



**Pharmacological application of microemulsion formulated with
rhizopus sp extract**

**Aplicação farmacológica de microemulsão formulada com extrato de
*rhizopus sp***

**Aplicación farmacológica de la microemulsión formulada con extracto
de *rhizopus sp***

DOI: 10.55905/oelv22n2-157

Originals received : 01/02/2024

Acceptance for publication: 02/09/2024

Valéria Maria Sousa Leitão

Master of Science concentration area in Tocogynecology

Institution: Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina da Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Address: 1 Praça Gonçalves Dias, 21, Centro, São Luís - MA, CEP: 65020-240

E-mail: valeria.leitao@ufma.br

Marcos Valério Vieira Lyrio

Master in Chemistry concentration area in Chemistry of Natural Products

Institution: Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo
Address: Avenida Fernando Ferrari, 514, Campus Goiabeiras, Vitória, Espírito Santo,
CEP: 29075-910

E-mail: mrvaleriovieira@gmail.com

Gabriela Vanini

PhD in Sciences with concentration in Analytics

Institution: Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Address: Av. Horácio Macedo, 1281, Polo de Química, Cidade Universitária, Ilha do
Fundão, Rio de Janeiro – RJ, CEP: 21941-598

E-mail: gabrielavanini@iq.ufrj.br

Carolina Borges Cordeiro

Master in Adult Health area of concentration in Biochemistry

Institution: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Address: Número 1966, Vila Bacanga, São Luis – MA, CEP: 65080-805
E-mail: carolinacbc23@gmail.com

Matheus Filipe Leitão de Oliveira

Master in Chemistry

Institution: Instituto Federal do Maranhão (IFMA)

Address: Avenida Getúlio Vargas, N. 4, Monte Castelo, CEP: 65030-005

E-mail: matheusfilipe@acad.ifma.edu.br

Matheus Oliveira do Nascimento

Master in Pharmaceutical Sciences

Institution: Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Address: Avenida Universitária, lado ímpar, Ininga, Teresina – PI, CEP: 64049-550

E-mail: matheusodn@hotmail.com

Marcelo Souza de Andrade

PhD in Biotechnology area of concentration in Molecular Diagnostics

Institution: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Address: Av. dos Portugueses, n.1966, Bacanga, São Luís – MA, CEP: 65080-805

E-mail: marcelo.andrade@ufma.br

André Luis Menezes Carvalho

PhD in Pharmaceutical Sciences

Institution: Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Address: Campus Universitário Ministro Petrônio Portela Ininga, Teresina – PI,
CEP: 64049-550

E-mail: aluismenezes@yahoo.com.br

Arlan Silva Freitas

PhD in Animal Science by Universidade Estadual de Londrina (UEL – PR)

Institution: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) -
campus São Luis

Address: Avenida Getúlio Vargas, N. 4, Monte Castelo, CEP: 65030-005

E-mail: arlan@ifma.edu.br

Wanderson RomãoPhD in Chemistry, Analytical Chemistry area of concentration in Analytical
InstrumentationInstitution: Centro Multiusuário de Pesquisa Inovação de Vila Velha do Instituto Federal
do Espírito Santo (CMVV - IFES)Address: Avenida Ministro Salgado Filho, s/nº, Soteco, Vila Velha – ES,
CEP: 29106-010

E-mail: wandersonromao@gmail.com

Flávia Castello Branco Vidal

PhD in Human and Experimental Biology
Institution: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Address: 1966, Vila Bacanga, São Luís – MA, CEP: 65080-805
E-mail: flavia.vidal@ufma.br

Amanda Mara Teles

PhD in Biotechnology area of concentration in Health
Institution: Programa de Pós-Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal da
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Address: Cidade Universitária Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, n.º 1000, Jardim
São Cristóvão, São Luís – MA, CEP: 65055-310
E-mail: amandatelespesq@gmail.com

Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento

PhD in Medicine area of concentration in Health Sciences
Institution: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Address: Número 1966, Vila Bacanga, São Luís – MA, CEP: 65080-805
E-mail: maria.desterro@ufma.br

ABSTRACT

Fungi have been recognized as a great source of bioactive metabolites with great medical and pharmaceutical applicability. The objective of this work was to produce a fungal extract from *Rhizopus* spp and identify the secondary metabolites obtained, followed by preparation of a microemulsion formulated with *Rhizopus* sp extract; characterizing its antioxidant and antimicrobial activity. Among the metabolites obtained, sorbitol, linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, and stearic acid stand out. The formulated microemulsion proved to be an effective pharmacological presentation in preserving the metabolites obtained from the fungal extract, and also potentiating in relation to the extract, when comparing the antioxidant activity and antimicrobial action.

Keywords: *Rhizopus*, secondary metabolites, microemulsion.

RESUMO

Os fungos têm sido reconhecidos como uma grande fonte de metabólitos bioativos com grande aplicabilidade médica e farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi produzir extrato fúngico a partir do *Rhizopus* spp e identificar os metabólitos secundários obtidos, seguido de preparo de microemulsão formulada com extrato de *Rhizopus* sp; caracterizando sua atividade antioxidante e antimicrobiana. Dentre os metabólitos obtidos destaca-se sorbitol, ácido linoléico, ácido oléico, ácido palmítico, e ácido esteárico. A microemulsão formulada se mostrou uma apresentação farmacológica eficaz na preservação dos metabólitos obtidos do extrato fúngico, e ainda potencializadora em relação ao extrato, quando comparou-se a atividade antioxidante e ação antimicrobiana.

Palavras-chave: *Rhizopus*, metabólitos secundários, microemulsão.

ANEXO C

OJS 3.8.4-2014
observatoriolatinoamericano.com

INÍCIO / Submissões

Submissões

[Fazer nova submissão](#) ou [ver suas submissões pendentes](#).

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

- ✓ A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
- ✓ O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
- ✓ Onde disponível, os URLs para as referências foram fornecidos.
- ✓ O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
- ✓ O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na página Sobre a Revista.

Diretrizes para Autores

A Revista **Observatório de la Economía Latinoamericana** aceita apenas artigos originais, não publicados em outros periódicos. Aceitamos artigos apresentados em eventos, desde que essas

informações sejam disponibilizadas pelos autores.

As normas para formatação e preparação de originais são:

- Máximo de 20 páginas;
- Idiomas permitidos: Português, Inglês e, Espanhol;
- Autoria: máximo de 8 autores por artigo;
- Fonte Arial tamanho 12, espaçamento entre linhas 1,5;
- As Figuras e Tabelas devem vir correspondentes do texto, editáveis, em fonte 10, tanto para o conteúdo quanto para o título (que deve vir logo acima dos elementos gráficos) e fonte (que deve vir logo abaixo do elemento gráfico).
- Título em português, inglês ou espanhol, no início do arquivo, com fonte 14;
- Resumo ou resumo, acompanhado de palavras-chave e palabras clave, com espaçamento simples, logo abaixo do título;
- As referências devem seguir as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
- O arquivo submetido não deve conter a identificação dos autores.

Taxa de Publicação

- Esta revista não cobra taxa de submissão;
- Esta revista cobra a publicação de artigos, no valor de: R\$ 685,00 (brasileiros) por artigo a publicar e 180 usd (outras nacionalidades).

Articles

Section default policy

Fazer uma nova submissão para a seção [Articles](#).

Declaração de Direito Autoral

A Revista **Observatorio de la Economía Latinoamericana** reserva-se o direito de modificar as alterações normativas, ortográficas e gramaticais originais, a fim de manter o padrão de culto da linguagem, respeitando o estilo dos autores. Os trabalhos finais não serão enviados aos autores.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ENVIAR SUBMISSÃO

IDIOMA

English

Português (Brasil)

EDIÇÃO ATUAL

ATOM 1.0

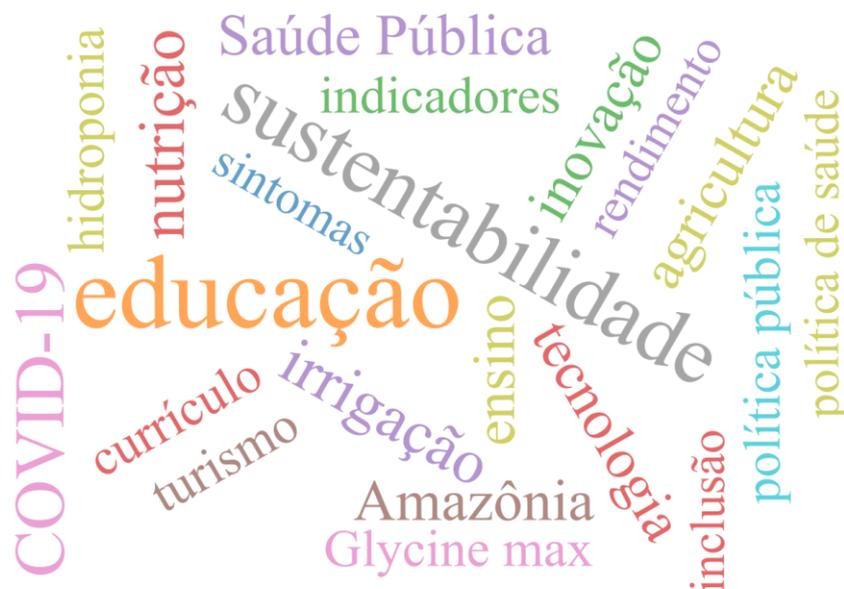
RSS 2.0

RSS 1.0

VISITANTES



PALAVRAS-CHAVE



MAIS LIDOS DA SEMANA

É seguro utilizar aços inoxidáveis austeníticos Cr-Mn na indústria alimentícia? Uma revisão sistemática

👁 154

Quantidade de palha de azevém na superfície do solo e produtividade de soja em plantio direto sob integração lavoura pecuária

👁 99

Aprendizagem significativa e o uso de metodologias ativas na educação profissional e tecnológica

👁 55

Propolis extract supplementation in the complementary treatment of adults and elderly with Type 2 Diabetes Mellitus: a systematic review of clinical trial

👁 50

Structure and composition of avifauna in two forest areas in Western Amazonia

👁 34

CONTATO

revista@observatoriolatinoamericano.com



Este trabalho está licenciado com uma Licença [Creative Commons Atribuição-NãoComercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).



Platform &
workflow by
OJS / PKP

ANEXO D

VIVO 06:07 85%

AA sucupira.capes.gov.br

+

ISSN:

Título:
 Observatorio de La Economía Latinoamericana

Classificação:



Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Clas
1696-8352	OBSERVATORIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA	BIOTECNOLOGIA	A4

1

1 a 0 de 0 registro(s)

< >   

ANEXO E

Artigo submetido

Brazilian Journal of Microbiology
Biological activities of the Rhizopus sp. extracts and microemulsions
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Biological activities of the Rhizopus sp. extracts and microemulsions
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Biotechnology and Industry
Funding Information:	
Abstract:	Fungi are one of the seven kingdoms of living organisms, and their secondary metabolites have a wide range of biological activities. The broad applicability of fungal metabolites in the pharmaceutical industry as antioxidant, antimicrobial and antitumor agents suggests that more studies on new alternatives agents for cervical cancer treatment and antimicrobials are needed due to the increasing resistance of bacteria to currently available antibiotics. The aim of the present study was to evaluate the biological activities of secondary metabolites obtained from the extract of <i>Rhizopus</i> sp., analyze their cytotoxicity in the tumor cell lines HeLa, SiHa, Caco-2 and B16-F10, and evaluate the antimicrobial activities of the <i>Rhizopus</i> sp. extract and microemulsion formulated against yeasts (<i>Candida</i> sp.). The antimicrobial tests demonstrated the promising activity of the extract, revealing strong/optimal antimicrobial activity and antifungal effects against different <i>Candida</i> spp. Moreover, these properties were optimized after the extract was formulated into a microemulsion. The data here show that biomass extracts are a possible source of adjuvant drugs for the treatment of cervical cancer.
Corresponding Author:	Valéria Maria Sousa Leitão, PhD student Universidade Federal do Maranhão São Luís, Maranhão BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Maranhão
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Valéria Maria Sousa Leitão, PhD student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Valéria Maria Sousa Leitão, PhD student Kênia Victória Pereira Abdala Rita de Nazare Silva Alves Karina Miyuki Retamiro Katia Regina Assunção Borges Araújo Flávia Castello Branco Vidal Amanda Mara Teles Geusa Felipa de Barros Bezerra Celso Vataru Nakamura Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	This manuscript is a product of my doctoral thesis.

[Click here to view linked References](#)

Biological activities of the *Rhizopus* sp. extracts and microemulsions

Valeria Maria Sousa Leitão ^{1*}, Kênia Victória Pereira Abdala ², Rita de Nazare Silva Alves ³, Karina Miyuki Retamiro ⁴, Katia Regina Assunção Borges Araújo ⁵, Flávia Castello Branco Vidal ⁶, Amanda Mara Teles ⁷, Geusa Felipa de Barros Bezerra ⁸, Celso Vataru Nakamura ⁹, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento ¹⁰

¹. Doctoral student, Graduate Program in Biotechnology - RENORBIO, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

². Master's Degree in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

³. Master's student, Graduate Program in Health and Environment. Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁴. Doctoral student, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

⁵. PhD in Biotechnology in Health, Northeast Biotechnology Network, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁶. Professor, Graduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁷. Professional Graduate Program in Animal Health Defense, State University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁸. PhD in Biotechnology, Professor, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁹. Senior Professor, State University of Maringá, Laboratory of Technological Innovation in the Development of Pharmaceuticals and Cosmetics, Maringá, Paraná, Brazil.

¹⁰. Professor at the Graduate Program in Adult Health PPGSAD/UFMA and at the RENORBIO Northeast Biotechnology Network, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

1 **ABSTRACT:** Fungi are one of the seven kingdoms of living organisms, and their
2 secondary metabolites have a wide range of biological activities. The broad
3 applicability of fungal metabolites in the pharmaceutical industry as antioxidant,
4 antimicrobial and antitumor agents suggests that more studies on new alternatives
5 agents for cervical cancer treatment and antimicrobials are needed due to the
6 increasing resistance of bacteria to currently available antibiotics. The aim of the
7 present study was to evaluate the biological activities of secondary metabolites
8 obtained from the extract of *Rhizopus sp.*, analyze their cytotoxicity in the tumor cell
9 lines HeLa, SiHa, Caco-2 and B16-F10, and evaluate the antimicrobial activities of the
10 *Rhizopus sp.* extract and microemulsion formulated against yeasts (*Candida sp.*). The
11 antimicrobial tests demonstrated the promising activity of the extract, revealing
12 strong/optimal antimicrobial activity and antifungal effects against different *Candida*
13 spp. Moreover, these properties were optimized after the extract was formulated into a
14 microemulsion. The data here show that biomass extracts are a possible source of
15 adjuvant drugs for the treatment of cervical cancer.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 **Keywords:** extract; fungus; *Rhizopus sp.*; microemulsion; antimicrobial; cancer
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Introduction

Fungi are one of the seven kingdoms of living organisms[1], and their secondary metabolites exhibit a wide variety of biological activities[2]. The variety of fungal species and the diversity of their habitats, some of which have been less explored, suggest that fungi remain a rich source of new metabolites[3]. Fungi are eukaryotic microorganisms that produce many natural products with diverse chemical structures and biological activities, such as the antibiotic penicillin[4], lovastatin (a lipid-lowering agent that reduces cholesterol levels)[5], cyclosporine A (an immunosuppressive agent)[6], and carcinogenic aflatoxins[7,8]. Structurally, fungal natural products are mainly polyketides, nonribosomal peptides, terpenoids, alkaloids[9] and their hybrids[10]. Owing to their sometimes opposing biological activities (e.g., beneficial drugs and harmful toxins) and intriguing chemical structures, the natural products produced by fungi have attracted significant attention from biologists, chemists and biotechnologists[11].

Fungi also synthesize secondary metabolites with various anticancer properties[12]. Some endophytic fungi produce immunostimulants using compounds obtained from plants[13]. The anticarcinogenic properties of the fungal metabolites in extracts (aqueous, ethanolic and methanolic) or chemical compounds obtained from fungal cultures have been tested[14-16]. Approximately 77 new cancer drugs were approved by the FDA in recent years; however, most cancers remain without treatments. Importantly, advances in discovery and development platforms, the identification of new targets, and the emergence of new technologies have expanded treatment options for cancer patients[17].

The applicability of fungal metabolites in the pharmaceutical industry due to their antioxidant, antimicrobial and antitumor properties highlights the importance of conducting more studies to identify new alternatives for the treatment of cervical cancer and new antimicrobial agents due to increasing resistance of bacteria to the available antibiotics. The aim of the present study was to evaluate the biological activities of secondary metabolites obtained from the extract of *Rhizopus sp.*, analyze their toxicity to the tumor cell lines HeLa, SiHa, Caco-2 and B16-F10, and evaluate the antimicrobial

1 activity of the *Rhizopus* sp. extract and the its microemulsion formulation against
2 yeasts (*Candida* sp.).
3
4

5 6 **2. Materials and Methods** 7

8 9 10 **2.1. Preparation and characterization of the *Rhizopus* sp. extract** 11

12 The *Rhizopus* sp. extract was prepared by adding small discs of mycelia
13 (approximately 6 mm) to Erlenmeyer flasks containing 250 mL of Sabouraud dextrose
14 broth followed by fermentation for 22 days at 25°C. Then, the fermented broth was
15 separated from the mycelial biomass via filtration.
16
17

18 Ethanol PA was added to the filtered fermentation broth at a 1:1 ratio, and the
19 mixture was concentrated in a rotary evaporator 24 h later. The solvent ethyl acetate
20 (EtOAc) was subsequently added to the alcoholic fungal extract at a 1:1 ratio, and the
21 resulting heterogeneous mixture was allowed to separate in a separatory funnel for 24
22 h. The obtained organic phase was concentrated via rotary evaporation.
23
24

25 The crude EtOAc extract was obtained after dehydration of the concentrated
26 organic phase in a freeze dryer (Liotop, model L101) under vacuum (less than 500
27 μ Hg) at -50°C for 48 h of lyophilization.
28
29

30 31 32 **2.1.1. Chemical analysis of the fungal extract via Orbitrap mass 33 spectrometry (Orbitrap-MS)** 34

35 The freeze-dried fungal extract samples were prepared as solutions with a
36 concentration of 1.00 mg/mL in methanol containing 0.1% v/v HCOOH (for electrospray
37 ionization (ESI)(+) mode) or 0.1% v/v NH₄OH (for ESI(-) mode). The samples were
38 subsequently diluted 100-fold with methanol containing 0.1% v/v HCOOH or NH₄OH
39 and injected directly (direct infusion) into the ESI source at a flow rate of 10 μ L/min.
40 The dynamic ion acquisition range of the Orbitrap Q-Exactive Plus analyzer (Thermo
41 Scientific, Bremen, Germany) was m/z 100-1000, where the sheath gas flow rate was
42 10; the sweep gas flow rate was 0; the spray voltage was 3000 V in ESI(-) mode and
43 3500 V in the ESI(+) mode; the capillary temperature was 350°C; the auxiliary gas flow
44 was 5; and the S-Lens was 50.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The acquired spectra were the accumulation of 100 scans. Analyses were
2 performed in positive mode with a resolving power of 140,000 at m/z 200. External
3 calibration for ESI(+) mode was performed using a solution containing caffeine, Met-
4 Arg-Phe-Ala acetate salt (MRFA) and Ultramark® 1621. For the ESI(-) mode, a solution
5 containing sodium dodecyl sulfate, sodium taurocholate and Ultramark® 1621
6 (Thermo Scientific, Bremen, Germany) was used. The mass spectra were acquired
7 and processed with Xcalibur software, version 2.2 (Thermo Scientific, Bremen,
8 Germany). The compounds were identified by determining the molecular formula
9 (C_cH_hN_nO_o) on the basis of the exact mass and by comparison with previous studies
10 in the literature that investigated similar matrices[18-22].
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 **2.2. Generation of the *Rhizopus* sp. extract microemulsion formulation**

22 The microemulsions were prepared via the conventional titration method
23 described by Bomfin (2021)[23]. First, mixtures of isopropyl myristate with Tween
24 80/isopropyl alcohol (3:1) at proportions of 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 and 9:1
25 were made. Microemulsions containing *Rhizopus* extract were prepared by mixing the
26 fungal extract with the oil phase (isopropyl myristate) at a concentration of 9000 µg/mL.
27 The oil phase was then mixed with a combination of surfactant (Tween 80) and
28 cosurfactant (isopropyl alcohol) under constant agitation, and water was gradually
29 added to the system, which was maintained at room temperature. More information on
30 the generation of this formulation is given by Leitão et al.[24].
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **2.2.1. Characterization of the *Rhizopus* sp. extract microemulsion**

43 The hydrodynamic size of the microemulsion was determined via dynamic light
44 scattering (DLS) with a Zetasizer (Malvern Zetasizer ver. 7.03, mal1098091). To
45 measure the droplet size via DLS, the samples were prepared from a 1:1000 dilution
46 of the formulation in distilled water. From this analysis, the size distribution, average
47 size and polydispersity index (PDI) were qualitatively determined, wherein a lower PDI
48 is indicative of a smaller size distribution and therefore greater material homogeneity.
49 Zeta potential measurements were also performed with the Malvern Zetasizer. The
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 microemulsion suspensions were diluted to a concentration of 1:1000 and placed in a
2 cuvette for analysis.
3
4
5

6 **2.3. In vitro biological activities of the *Rhizopus* sp. extract and** 7 **microemulsion** 8

9 **2.3.1. Antimicrobial activity** 10

11 **2.3.1.1. Bacterial strains and culture conditions** 12 13 14

15 The following standard strains were obtained from the American Type Culture
16 Collection (ATCC): *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC®
17 25922™), *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Rosenbach (ATCC® 12600™),
18 *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC® 27853™) and *Salmonella*
19 *enterica* subsp. enterica (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar
20 Choleraesuis (ATCC® 12011™). These strains were evaluated at a cell concentration
21 of 1.5×10^8 colony-forming units per milliliter (CFU/mL) according to the McFarland
22 scale recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute[25].
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **2.3.1.2. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and** 34 **minimum bactericidal concentration (MBC) via the microplate dilution method** 35 36 37 38 39

40 The bacterial suspension was standardized by adding a 24-h culture to a tube
41 containing sterile saline solution until it reached a turbidity equal to that of the 0.5
42 suspension on the McFarland scale (approximately 1.5×10^8 CFU/mL). This result was
43 verified spectrophotometrically at 600 nm, were an absorbance value of 0.10 to 0.15
44 corresponded to 1.5×10^8 CFU/mL.
45
46
47
48

49 First, 100 μ L of the extracellular extract, biomass extract or a microemulsion of
50 *Rhizopus* sp. prepared in a stock solution of Mueller–Hinton broth (CMH) with 0.1%
51 dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to a sterile 96-well microplate. Each sample
52 was tested with seven bacterial concentrations (500 to 7.8125 μ g/mL) to determine the
53 optimal antimicrobial potential. To ensure that the media was sterile, only CMH was
54 added to the negative control sample. The positive control was gentamicin (32 to 0.5
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 $\mu\text{g/mL}$), which is effective against a broad spectrum of strains, prepared in a stock
2 solution of CMH with 0.1% DMSO.

3
4 The plates were incubated for 24 h. After incubation, 20 μL of a 3% resazurin
5 solution was added to each well, followed by an additional 4 h of incubation. After
6 incubation, the final visual reading was performed. A blue color in the wells was
7 interpreted as the absence of bacterial growth on the plate, while the development of
8 a pink color was interpreted as the presence of bacterial growth.

9
10 The MIC was defined as the lowest concentration of the sample capable of
11 inhibiting the growth of 90% of the strains, i.e., the lowest concentration of the
12 extracellular extract, biomass extract or *Rhizopus* microemulsion capable of preventing
13 the color change from blue to pink. After the MIC was determined, three 100 μL aliquots
14 were removed for subculture on standard counting agar (PCA) plates containing the
15 concentration considered the MIC and the concentrations immediately higher. After 24
16 h of incubation at $35\pm 2^\circ\text{C}$, the MBC was considered the concentration at which 20
17 CFU/mL or less were observed on the PCA.

29 30 **2.3.1.3. Yeast strains and culture conditions**

31
32 The following standard *Candida* strains were obtained from the ATCC for the
33 antimicrobial tests: *C. albicans* ATCC 443-805-2, *C. parapsilosis* ATCC 726-42-6.
34 Additionally, *Candida tropicalis* ATCC 1036-09-2 was obtained from the Fungi
35 Collection of the Laboratory of Immunology and Mycology (NIBA/UFMA). Each strain
36 was tested at a cell concentration of 1.5×10^8 CFU/mL according to the McFarland scale
37 recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute[25].

38 39 **2.3.1.4. Determination of the MIC and minimum fungicidal concentration** 40 **(MFC) via the microdilution method in microplates**

41
42 The MIC was determined via the microdilution technique with triplicate samples
43 in 96-well microplates (Kasvi, Italy). One hundred microliters of RPMI liquid medium
44 (Sigma–Aldrich®) was added to each well of the plate. Subsequently, 100 μL of the
45 sample was dispensed into the wells of the first row of the plate, after which serial
46 dilutions were made by taking a 100 μL aliquot from the most concentrated well and

1 adding it to next successor well to obtain final concentrations ranging from 1000 to
2 1.95 µg/mL.
3

4 Finally, 10 µL of yeast inoculum (at a concentration of 0.5 on the McFarland
5 scale, approximately 1.5×10^8 CFU/mL) was added to the wells, with each column of
6 the plate containing a specific fungal strain. Controls (for fungal viability and the RPMI
7 1640 liquid culture medium) were treated under the same conditions as the test
8 samples. The plates were sealed and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24–48 h.
9

10 After incubation, 20 µL of a 3% resazurin solution was added to each well,
11 followed by an additional 4 h of incubation. Then, the final visual reading was
12 performed, in which a blue color was interpreted as the absence of yeast growth, while
13 the development of a pink color was interpreted as the presence of yeast growth.
14

15 The MIC was defined as the lowest concentration of the sample capable of
16 inhibiting the growth of 90% of the strains, i.e., the lowest concentration of the *Rhizopus*
17 extracellular extract, biomass extract or microemulsion capable of preventing the color
18 change from blue to pink. After the MIC was determined, three 100 µL aliquots were
19 removed for subculture on 100 µL was removed for subculture (in triplicate) on
20 Sabouraud dextrose agar (SDA) plates containing the concentration considered MIC
21 and the concentrations immediately higher. After 48 h of incubation at $35 \pm 2^\circ\text{C}$, the MFC
22 was considered the concentration at which 20 CFU/mL or less were observed on the
23 SDA.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **2.3.2. Antitumor activity**

39 **2.3.2.1. Cell culture**

40 The HeLa, SiHa and Caco-2 cells were maintained in DMEM containing 10%
41 fetal bovine serum and 1% antibiotics (streptomycin and penicillin) in a 5% CO₂
42 atmosphere at 37°C. PC-3 and B16-F10 cells were maintained in RPMI medium
43 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (streptomycin and
44 penicillin) in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **2.3.2.2. Evaluation of cell viability via the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-** 56 **diphenyltetrazolium (MTT) colorimetric method**

1 To evaluate whether the *Rhizopus* sp. extract and microemulsion exhibited
2 anticancer activity, the samples were initially tested in the HeLa, PC-3, B16-F10 and
3 VERO cells as controls. The extracellular biomass extracts of *Rhizopus* sp., were
4 evaluated at 1000, 500, 100 and 20 µg/mL, and the biomass and white microemulsions
5 were evaluated at 1000, 500, 100, 20 and 2 µg/mL.
6
7
8
9

10 The cells were cultivated in their respective culture media, plated in a 96-well
11 plate at a concentration of 2.5×10^5 cells/mL (100 µL), and the mixture was incubated
12 for 24 h at 37°C with 5% CO₂.
13
14
15
16

17 The *Rhizopus* sp. extracellular extract, biomass extract, biomass
18 microemulsion and white microemulsion were then added, and the mixture was
19 incubated for 24 h. After 24 h, 50 µL of a 2 mg/mL MTT solution was added, and the
20 plate was incubated again for 4 h at 37°C in 5% CO₂ in the dark. Then, 150 µL of
21 DMSO was added, and the absorbance was measured with a microplate reader (BIO-
22 TEK Power Wave XS) at 570 nm. The concentration that inhibited 50% of the cells
23 (IC₅₀) was defined as the concentration capable of reducing the optical density of the
24 treated cells by 50% compared with that of the negative control and was determined
25 via nonlinear regression. The tests were performed in triplicate.
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **2.4. Ethical considerations**

36 Because this was a study involving the collection and analysis of specimens of
37 fungal origin, this study was submitted to and approved by the System of Authorization
38 and Information on Biodiversity - SISBIO with registration number 91276-1.
39
40
41
42
43
44

45 **2.5. Statistical analysis**

46 One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's or Tukey's post
47 hoc test was performed for statistical analysis, according to the type of analysis.
48 Differences were considered significant when $p < 0.05$. GraphPad Prism software,
49 version 8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for analysis.
50
51
52
53
54
55
56
57

58 **3. Results**

3.1. Macro- and microscopic identification of *Rhizopus* sp.

The mycelium of *Rhizopus* (zygomycete) has its own structures for asexual reproduction via sporulation. Figure 1 shows colonies with cottony mycelia and black sporangia, which are characteristic of *Rhizopus*. These macroscopic analyses were complemented with microscopic identification of the sporangiophores (special hyphae that emerge from certain points of the mycelium) and the sporangium at its end (location at which the spores are produced), as shown in Figure 2.

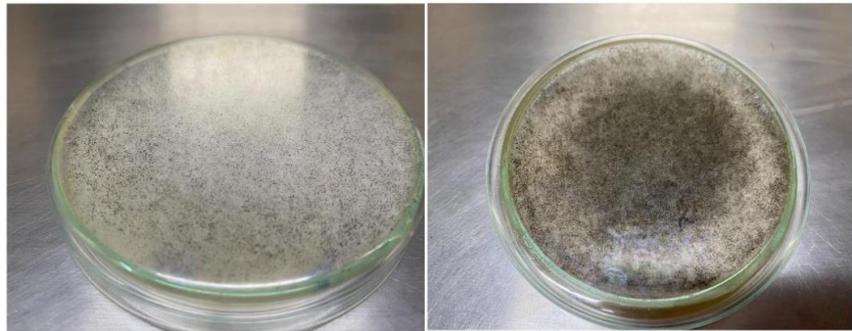


Figure 1 Macroscopic identification of *Rhizopus*. (A) Colonies on PDA with abundant cottony mycelia. (B) Colonies with black sporangia.



Figure 2 Microscopic identification of *Rhizopus* sp. (A) Black multispore globose sporangia. (B) Subglobose to globose sporangiophore and columella. (C) Sporangiospores and basal rhizoid.

3.2. Molecular identification by polymerase chain reaction (PCR)

PCR was used to identify the samples belonging to the genus *Rhizopus*. Figure 3 shows the results obtained via electrophoresis. The resulting fragment was approximately 214 bp in length, which is consistent with what has been described in the literature[26].

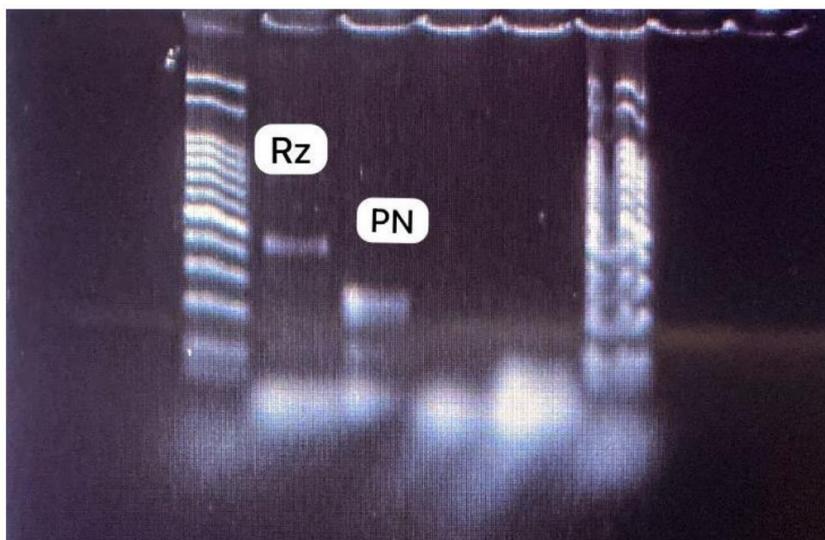


Figure 3 Representative 1.5% electrophoresis gel containing samples of the genus *Rhizopus* (Rz) and the species *Penicillium citrinum* (PN). Source: author.

3.3. Chemical analysis of fungal extracts via Orbitrap-MS

The *Rhizopus* extract, which was isolated from the Maranhão region, contained a variety of metabolites as determined via chemical analysis. Five fatty acids, including palmitic acid, linoleic acid, oleic acid and stearic acid, stood out, in addition to sugars and their derivatives. The mass spectrogram, shown in Figure 4, reveals the characteristic peaks of the compounds found, showing those found in greater amounts.

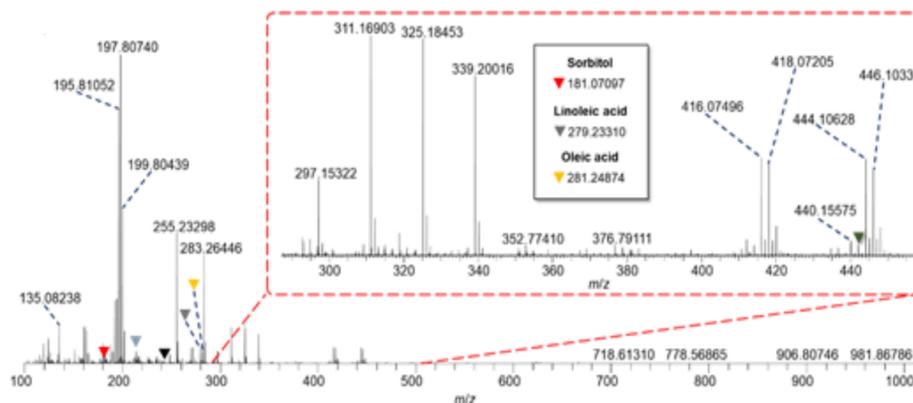


Figure 4 ESI(+)-Orbitrap-MS spectrum of the *Rhizopus* sp. extract.

3.4. Biological activities of the *Rhizopus* sp. extracellular extract, biomass extract and microemulsion

3.4.1. Antimicrobial activity

The MIC is the lowest concentration of a substance necessary to inhibit the growth of bacteria. Several substances, including the *Rhizopus* sp. extracts and a microemulsion, were tested and compared with gentamicin, a standard antibiotic, as shown in Table 1.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations of the *Rhizopus* sp. extracellular extract, biomass extract and microemulsion with different bacteria after 24 h of treatment.

Sample	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Rhizopus sp.</i> extracellular extract	250 \pm 0.00	125 \pm 0.00	500 \pm 0.00	500 \pm 0.00
<i>Rhizopus sp.</i> biomass extract	125 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00	250 \pm 0.00	250 \pm 0.00
White microemulsion	nd	nd	nd	nd
<i>Rhizopus sp.</i> biomass microemulsion	31.25 \pm 0.00	15.625 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00
Gentamicin	8.0 \pm 0.00	2.0 \pm 0.00	16.0 \pm 0.00	16.0 \pm 0.00

MIC: minimum inhibitory concentration; nd: not determined. The values of triplicate samples are presented as the means \pm standard deviations.

Source: authors (2024).

The extracts of *Rhizopus sp.* inhibited bacterial growth at considerably higher concentrations than gentamicin. For example, the extracellular extract of *Rhizopus sp.* had an MIC of 250 $\mu\text{g/mL}$ against *E. coli*, whereas gentamicin had an MIC of 8.0 $\mu\text{g/mL}$. For *S. aureus*, the MIC of this extract was 125 $\mu\text{g/mL}$, whereas the MIC was 2.0 $\mu\text{g/mL}$ for gentamicin. Higher MICs were also obtained for *P. aeruginosa* and *Salmonella*, both of which were 500 $\mu\text{g/mL}$, compared with 16 $\mu\text{g/mL}$ for gentamicin.

Although MICs of the biomass extract were better, they were still much higher than those of gentamicin. For *E. coli*, the biomass extract presented an MIC of 125 $\mu\text{g/mL}$, whereas the MIC for gentamicin was 8.0 $\mu\text{g/mL}$. For *S. aureus*, the biomass extract gave an MIC of 62.5 $\mu\text{g/mL}$, whereas the MIC for gentamicin was 2.0 $\mu\text{g/mL}$. For *P. aeruginosa* and *Salmonella*, the biomass extract gave an MIC of 250 $\mu\text{g/mL}$, whereas the MIC for gentamicin was 16 $\mu\text{g/mL}$.

The biomass microemulsion of *Rhizopus sp.* gave the closest MIC values to those of gentamicin. The MIC of the microemulsion was 31.25 $\mu\text{g/mL}$ against *E. coli*, whereas the MIC of gentamicin was 8.0 $\mu\text{g/mL}$. Similarly, for *S. aureus*, the biomass microemulsion of *Rhizopus sp.* had an MIC of 15.625 $\mu\text{g/mL}$, which was greater than that of gentamicin (2.0 $\mu\text{g/mL}$).

Table 2 presents the MBCs of the *Rhizopus* extracellular extract, biomass extract and microemulsion and gentamicin with bacteria after 24 h of treatment.

Table 2. Minimum bactericidal concentrations of the *Rhizopus* extracellular extract, biomass extract and microemulsion with different bacteria after 24 h of treatment.

Sample	MBC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Rhizopus</i> sp. extracellular extract	500 \pm 0.00	250 \pm 0.00	500 \pm 0.00	500 \pm 0.00
<i>Rhizopus</i> sp. biomass extract	125 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00	500 \pm 0.00	500 \pm 0.00
White microemulsion	ni	ni	ni	ni
<i>Rhizopus</i> sp. biomass microemulsion	31.25 \pm 0.00	15.625 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00
Gentamicin	8.0 \pm 0.00	2.0 \pm 0.00	16.0 \pm 0.00	16.0 \pm 0.00

MFC: minimum fungicidal concentration; ni: no inhibition. The values of triplicate samples are presented as the means \pm standard deviations.

Source: authors (2024)

The *Rhizopus* biomass microemulsion was the most effective among all the samples tested, presenting the lowest MBCs, especially against *E. coli* (31.25 $\mu\text{g/mL}$) and *S. aureus* (15.625 $\mu\text{g/mL}$).

The MIC data revealed the lowest concentration of each substance necessary to inhibit the growth of yeast. The *Rhizopus* sp. extracts and microemulsion were compared with amphotericin B, a standard antibiotic, as shown in Table 3.

Table 3. Minimum inhibitory concentrations of the *Rhizopus* sp. extracellular extract, biomass extract and microemulsion with different yeast cultures after 24 h of treatment.

Sample	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	C.	C.	C.
	<i>albicans</i>	<i>parapsilosis</i>	<i>tropicalis</i>
<i>Rhizopus</i> sp. extracellular extract	500 \pm	250 \pm 0.00	250 \pm 0.00
<i>Rhizopus</i> sp. biomass extract	125 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00	125 \pm 0.00
White microemulsion	nd	nd	nd
<i>Rhizopus</i> sp. biomass microemulsion	62.5 \pm 0.00	7.81 \pm 0.00	15.63 \pm 0.00
Amphotericin B	32.0 \pm 0.00	16 \pm 0.00	16.0 \pm 0.00

MIC: minimum inhibitory concentration; nd: not determined. The values of triplicate samples are presented as the means \pm standard deviations.

Source: authors (2024).

The results of the MIC tests revealed that, against the yeast *C. albicans*, the *Rhizopus* biomass microemulsion was the most effective, with MIC of 62.5 $\mu\text{g/mL}$, although amphotericin B showed the greatest efficacy, with an MIC of 32 $\mu\text{g/mL}$.

In the case of *C. parapsilosis*, the *Rhizopus* biomass microemulsion showed greater efficacy, with an MIC of only 7.81 $\mu\text{g/mL}$, compared with that amphotericin B (16 $\mu\text{g/mL}$). With respect to the yeast *C. tropicalis*, the *Rhizopus* biomass microemulsion presented an MIC of 15.63 $\mu\text{g/mL}$, which was better than that of amphotericin B (16 $\mu\text{g/mL}$).

The blank microemulsion did not inhibit any of the tested yeast cultures (nd), confirming that the effects observed with the *Rhizopus* biomass microemulsion was due to the active components present in the biomass.

Table 4 shows the MFCs of the *Rhizopus* extracellular extract, biomass extract and microemulsion with the yeast cultures after 24 h of treatment. The tested samples were compared with the antifungal standard amphotericin B.

Table 4. Minimum fungicidal concentrations of the *Rhizopus* extracellular extract, biomass extract and microemulsion with different yeast cultures after 24 h of treatment.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Sample	MFC ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Rhizopus</i> sp. extracellular extract	500 \pm 0.00	250 \pm 0.00	250 \pm 0.00
<i>Rhizopus</i> sp. biomass extract	250 \pm 0.00	62.5 \pm 0.00	250 \pm 0.00
White microemulsion	ni	ni	ni
<i>Rhizopus</i> sp. biomass microemulsion	125 \pm 0.00	15.63 \pm 0.00	15.63 \pm 0.00
Amphotericin B	32.0 \pm 0.00	16 \pm 0.00	16.0 \pm 0.00

MFC: minimum fungicidal concentration; ni: no inhibition. The values of triplicate samples are presented as the means \pm standard deviations.

Source: authors (2024).

For the yeast *C. albicans*, the *Rhizopus* biomass microemulsion presented an MFC of 125 $\mu\text{g/mL}$, indicating that it is an effective antifungal agent, although amphotericin B presented a MFC of only 32 $\mu\text{g/mL}$, confirming its superiority as a standard for comparison. In the case of *C. parapsilosis*, the *Rhizopus* biomass microemulsion had a low MFC of 15.63 $\mu\text{g/mL}$, which was very close to the MFC of amphotericin B, 16 $\mu\text{g/mL}$. These findings suggest that the biomass microemulsion has considerable potential as an antifungal agent against *C. parapsilosis*.

For *C. tropicalis*, the *Rhizopus* biomass microemulsion again stood out, with an MFC of 15.63 $\mu\text{g/mL}$, which matched the efficacy of amphotericin B (MFC of 16 $\mu\text{g/mL}$). The blank microemulsion did not demonstrate inhibitory activity (nd) against any of the yeast cultures tested.

3.4.2. Antitumor activity

As shown in Table 5, the IC_{50} value of the HeLa cells was 56.22 $\mu\text{g/mL}$, while the IC_{50} values of SiHa, Caco-2 and B16-F10 cells were assumed to be greater than 1,000 $\mu\text{g/mL}$.

Table 5. Viability of Vero, HeLa, SiHa, Caco-2 and B16-F10 cells determined by the MTT method. The data are expressed as IC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$) after 24 h of incubation.

Extract	IC ₅₀ (µg/mL)			
	SiHa	HeLa	Caco-2	B16-F10
<i>Rhizopus</i> biomass	>1000	56.22±13.67	>1000	>1000

The values of triplicate samples are presented as the means ± standard deviations.
Source: authors (2024).

As shown in Figure 10, the MTT assay revealed that there was a relationship between the toxic effects and the concentration of *Rhizopus* biomass extract, indicating that cancer cell death is proportional to the concentration of the extract.

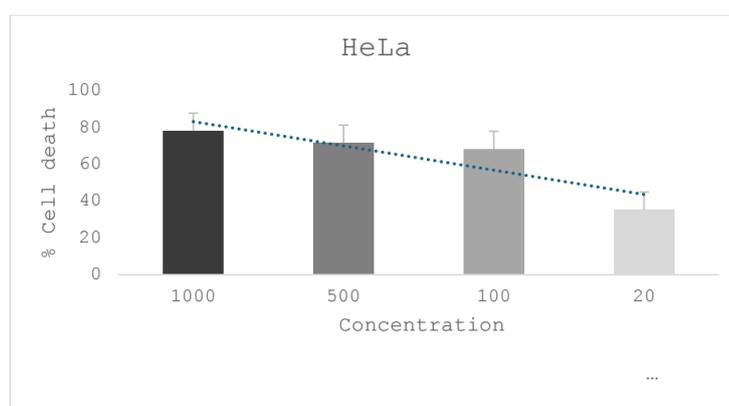


Figure 10 Cell death (%) as a function of the *Rhizopus* biomass concentration (µg/mL).

4. Discussion

With respect to antifungal activity, the criteria for determining the activity on the basis of the MIC were as follows: 50 to 500 µg/mL was considered strong/optimal antimicrobial activity; 600 to 1500 µg/mL was considered moderate activity; and above 1500 µg/mL was considered weak activity or an inactive product[25, 27-28]. The potential of using the *Rhizopus* extract as an antimicrobial agent clinically opens the possibility of its pharmaceutical development, which was optimized by incorporating the extract into a microemulsion. However, the transition from the laboratory to clinical practice requires further investigation, including clinical studies, to evaluate the safety and efficacy of these extracts in humans. In addition, increasing the specificity of the extract for different yeasts is crucial to ensure wide and versatile application.

In a study from 2021, the inhibitory effects of oat extracts fermented with *Rhizopus oryzae* on cancer cells were evaluated both in vitro and in vivo. The cell lines tested were HepG2, HeLa and HT-29, and the concentration-dependent toxicity of the ethyl acetate subfractions was revealed, with IC₅₀ values of 2.37, 0.75, 0.63 and 0.54 µg/mL, respectively. However, normal cells showed strong resistance to the ethyl acetate subfractions; thus, these subfractions selectively suppressed the proliferation of cancer cells but were nontoxic to normal cells[29]. *Rhizopus oligosporus* has also been evaluated upon culture with HeLa cells, and the thrombolytic activity of the HeLa cell culture medium was verified due to the release of t-PA. Notably, release of t-PA was 17.7 times greater in the HeLa cell culture than in the control culture. The authors concluded that the rate at which spermine suppressed t-PA release was remarkably high at a concentration of 1 µmol/mL, and the cancer cells were completely necrotic[30].

Another study evaluated the cytotoxicity and anticancer activity of 12 extracts of marine endophytic fungi, including *Rhizopus sp.*, in addition to other extracts, such as those from *Fomitopsis sp.*, *Acremonium sp.* and *Aspergillus niger*. The cytotoxicity assay was performed with the Vero cell line, and the anticancer activity was evaluated on HEP2 and A549 alveolar adenocarcinoma cells. The IC₅₀ for the *Rhizopus sp.* extract was 161 µg/mL with HEP2 cells and 185 µg/mL with A549 cells. Moreover, the results of the anticancer activity assay revealed that all the crude fungal extracts, with

1 the exception of the *Fomitopsis* sp. extract, were toxic to both cancer and normal
2 cells[31].
3

4 Bano et al.(2016)[32] reported the synthesis of a new anti-inflammatory
5 metabolite of a synthetic corticosteroid, medrysone (11 β -hydroxy-6 α -methylpregn-4-
6 ene-3,20-dione), via biotransformation. Medrysone was fermented with the
7 filamentous fungi *Cunninghamella blakesleeana*, *N. grosseira*, and *Rhizopus*
8 *stolonifer*, yielding seven new metabolites. The compounds obtained were considered
9 nontoxic when tested in 3T3 cells (mouse fibroblasts) and showed no activity when
10 tested against the HeLa and PC3 prostate cancer cell lines.
11

12 In 2011, a study evaluated the microbial transformation of (20S)-20-
13 hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one (1) by four filamentous fungi: *Cunninghamella*
14 *elegans*, *Macrophomina phaseolina*, *R. stolonifer*, and *Giberella fujikuroi*. This study
15 obtained nine new metabolites by microbial transformation, two of which were already
16 known. These metabolites were evaluated for their toxic effects to human cervical
17 carcinoma cells (HeLa). Only the known metabolite was tested, and was proven to be
18 nonactive against HeLa cells[26].
19

20 The bioconversion of trachyloban-18-oic acid by *Rhizopus arrhizus* provided
21 new metabolites that were evaluated for their binding affinity to the antiapoptotic protein
22 Bcl-xL and for their cytotoxicity against the KB oral squamous cell carcinoma and HCT-
23 116 human colon carcinoma cell lines. At 10 μ g/mL, the six biotransformation products
24 were nontoxic to KB and HCT-116 cells[34].
25

26 There have been no published studies evaluating the cytotoxic effects of
27 *Rhizopus* sp. biotransformation products and their anticancer activities in SiHa, Caco-
28 2 and B16-F10 cells.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

5. Conclusion

The antimicrobial results indicate the promising effects of the *Rhizopus* sp. extract, which revealed strong/optimal antimicrobial and antifungal activities against different species of *Candida*. These effects were optimized by formulating the extract into a microemulsion. Thus, biomass extracts are a possible source of adjuvant drugs for the treatment of cervical cancer.

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

1. Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., & Kirk, P. M. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, *10*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
2. Evidente, A., & Kiss, R. (2018). Editorial: Bioactive Fungal Metabolites. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(2). <https://doi.org/10.2174/092986732502180122153435>
3. Schueffler, A., & Anke, T. (2014). Fungal natural products in research and development. In *Natural Product Reports* (Vol. 31, Issue 10). <https://doi.org/10.1039/c4np00060a>
4. Campos, C., Lázaro-Rodríguez, T. G., Hernández-Pérez, E., Rincón-Heredia, R., & Fernández, F. J. (2020). Pexophagy modes during penicillin biosynthesis in *Penicillium rubens* P2-32-T. *Archives of Microbiology*, *202*(8). <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01939-3>
5. Xiong, Z., Cao, X., Wen, Q., Chen, Z., Cheng, Z., Huang, X., Zhang, Y., Long, C., Zhang, Y., & Huang, Z. (2019). An overview of the bioactivity of monacolin K / lovastatin. *Food and Chemical Toxicology*, *131*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110585>
6. Wu Q, Kuca K. Metabolic Pathway of Cyclosporine A and Its Correlation with Nephrotoxicity. *Curr Drug Metab.* 2019;20(2):84-90. doi: 10.2174/1389200219666181031113505.

- 1 7. Caceres, I., Khoury, A. Al, El Khoury, R., Lorber, S., Oswald, I. P., El Khoury, A.,
2 Atoui, A., Puel, O., & Bailly, J. D. (2020). Aflatoxin biosynthesis and genetic
3 regulation: A review. In *Toxins* (Vol. 12, Issue 3).
4
5 <https://doi.org/10.3390/toxins12030150>
6
7
8 8. Khan, R., Ghazali, F. M., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2021). Aflatoxin
9 biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: A review. In *Journal*
10 *of Fungi* (Vol. 7, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/jof7080606>
11
12
13 9. Quin, M. B., Flynn, C. M., & Schmidt-Dannert, C. (2014). Traversing the fungal
14 terpenome. In *Natural Product Reports* (Vol. 31, Issue 10).
15
16 <https://doi.org/10.1039/c4np00075g>
17
18 10. Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. A., & Fanelli, C. (2010). Natural
19 functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. In *Applied*
20 *Microbiology and Biotechnology* (Vol. 87, Issue 3). [https://doi.org/10.1007/s00253-](https://doi.org/10.1007/s00253-010-2657-5)
21 [010-2657-5](https://doi.org/10.1007/s00253-010-2657-5)
22
23
24 11. Prescott, T. A. K., Hill, R., Mas-Claret, E., Gaya, E., & Burns, E. (2023). Fungal
25 Drug Discovery for Chronic Disease: History, New Discoveries and New Approaches.
26 In *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/biom13060986>
27
28
29 12. Rybczyńska-Tkaczyk, K., Grenda, A., Jakubczyk, A., & Krawczyk, P. (2023).
30 Natural Bacterial and Fungal Peptides as a Promising Treatment to Defeat Lung
31 Cancer Cells. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 11).
32
33 <https://doi.org/10.3390/molecules28114381>
34
35
36 13. Woods, N., Niwasabutra, K., Acevedo, R., Igoli, J., Altwajry, N. A., Tusiimire, J.,
37 Gray, A. I., Watson, D. G., & Ferro, V. A. (2017). Natural Vaccine Adjuvants and
38 Immunopotentiators Derived From Plants, Fungi, Marine Organisms, and Insects. In
39 *Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition*.
40
41 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00011-6>
42
43
44 14. Sairi, A. M. M., Ismail, S. I., Sukor, A., Rashid, N. M. N., Saad, N., Jamian, S., &
45 Abdullah, S. (2020). Cytotoxicity and Anticancer Activity of *Donkioporiella mellea* on
46 MRC5 (Normal Human Lung) and A549 (Human Lung Carcinoma) Cells Lines.
47 *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020*.
48
49 <https://doi.org/10.1155/2020/7415672>
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 15. Song, F. Q., Liu, Y., Kong, X. S., Chang, W., & Song, G. (2013). Progress on
2 understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *Inonotus*
3 *obliquus*. In *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (Vol. 14, Issue 3).
4
5
6 <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.3.1571>
7
8 16. Szychowski, K. A., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Tobiasz, J., Yelnytska-Stawasz, V.,
9 Pomianek, T., & Gmiński, J. (2018). Biological and anticancer properties of *Inonotus*
10 *obliquus* extracts. *Process Biochemistry*, 73.
11
12 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.015>
13
14 17. Liu, J., Pandya, P., & Afshar, S. (2021). Therapeutic advances in oncology. In
15 *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 4).
16
17 <https://doi.org/10.3390/ijms22042008>
18
19 18. BIRCH, M. et al. Polar lipids of *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A.*
20 *flavus* and *A. terreus*. *Medical Mycology*, v. 36, n. 3, 1998
21
22 19. JIANG, Y. et al. Study on Secondary Metabolites of Endophytic Fungus,
23 *Aspergillus fumigatus*, from *Crocus sativus* L. Guided byUHPLC-HRMS/MS-Based
24 Molecular Network. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2022, 2022a.
25
26 20. MAZUMDER, K. et al. Identification of bioactive metabolites and evaluation of in
27 vitro anti-inflammatory and in vivo antinociceptive and antiarthritic activities of
28 endophyte fungi isolated from *Elaeocarpus floribundus* blume. *Journal of*
29 *Ethnopharmacology*, v. 273, 2021. 1a
30
31 21. NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the
32 *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009.
33
34 22. SALDAN, N. C. et al. Development of an analytical method for identification of
35 *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food Chemistry*, v.
36 241, 2018.
37
38 23. BOMFIN, M. K. Microemulsão como estratégia de liberação de bioativos em
39 formulações tópicas: revisão bibliográfica. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso
40 (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade
41 Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2021.
42
43 24. Leitão, V. M. S., Lyrio, M. V. V., Vanini, G., Cordeiro, C. B., De Oliveira, M. F. L.,
44 Do Nascimento, M. O., De Andrade, M. S., Carvalho, A. L. M., Freitas, A. S., Romão,
45 W., Vidal, F. C. B., Teles, A. M., & Do Nascimento, M. do D. S. B. (2024).
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Pharmacological application of microemulsion formulated with rhizopus sp extract.
2
3 *OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA*, 22(2).
4
5 <https://doi.org/10.55905/oelv22n2-157>
6
7 25. Wayne, P. (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
8 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards
9 Institute. *Clsi M100 Ed30:2020*.
10
11 26. Morales-Franco, B., Nava-Villalba, M., Medina-Guerrero, E.O. *et al.* Host-Pathogen
12 Molecular Factors Contribute to the Pathogenesis of *Rhizopus* spp. in Diabetes
13 Mellitus. *Curr Trop Med Rep* 8, 6–17 (2021). [https://doi.org/10.1007/s40475-020-](https://doi.org/10.1007/s40475-020-00222-1)
14 00222-1
15
16 27. Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., &
17 Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine
18 for the treatment of infectious diseases. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7).
19 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>
20
21 28. Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C.
22 T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils
23 from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4).
24 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>
25
26 29. Zhang, N., Zhao, L., Cai, S., Zeng, X., Wu, W., Ji, B., & Zhou, F. (2021). Ethyl
27 acetate subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa* L.) exert
28 anti-cancer properties in vitro and in vivo through G2/M and S Phase arrest and
29 apoptosis. *Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.7150/jca.48993>
30
31 30. Sumi, H., Mitsuo, T., & Yatagai, C. (2021). *Anti-cancer Activity of Tempeh –*
32 *Spermine Can Induce the Necrosis of HeLa Cells*. 570–570.
33
34 31. Ahamed, F., & Murugan, M. (2019). Isolation and Characterization of Marine
35 Endophytic Fungi from Seaweeds, and Bioactivity of their Crude extracts. *Journal of*
36 *Pure and Applied Microbiology*, 13(3). <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.15>
37
38 32. Bano, S., Wahab, A. T., Yousuf, S., Jabeen, A., MESAİK, M. A., Rahman, A. U., &
39 Choudhary, M. I. (2016). New anti-inflammatory metabolites by microbial
40 transformation of medrysone. *PLoS ONE*, 11(4).
41 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153951>
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 33. Choudhary, M. I., Erum, S., Atif, M., Malik, R., Khan, N. T., & Atta-Ur-Rahman.
2 (2011). Biotransformation of (20S)-20-hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one by four
3 filamentous fungi. *Steroids*, 76(12). <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.06.007>
4
5
6
7 34. Leverrier, A., Martin, M. T., Servy, C., Ouazzani, J., Retailleau, P., Awang,
8 K., Mukhtar, M. R., Guéritte, F., & Litaudon, M. (2010). Rearranged diterpenoids from
9 the biotransformation of ent-trachyloban-18- oic acid by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of*
10 *Natural Products*, 73(6). <https://doi.org/10.1021/np100145n>
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ANEXO F

Periódico a ser submetido o segundo artigo

19:49 📶 93

sucupira.capes.gov.br

+

SSN:

Título:
 Brazilian Journal of Microbiology

Classificação:
 -- SELECIONE --

Periódicos

ISSN	Título	Área com publicação no quadriênio	Clas
1517-8382	BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY	BIOTECNOLOGIA	A2
1678-4405	BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY (ONLINE)	BIOTECNOLOGIA	A2

1 a 0 de 0 registro(s)

PLATAFORMA Sucupira