



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB**

**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**Vinícius Arêdes Diniz**

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LIQUENS EM CULTURAS DE  
MICROORGANISMOS PATOGÊNICAS**

**BRASÍLIA**

**2023**

**Vinícius Arêdes Diniz**

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LIQUENS EM CULTURAS DE  
MICROORGANISMOS PATOGÊNICAS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Anabele Azevedo Lima  
Barbastefano

**BRASÍLIA**

**2023**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho para minha família, em especial meus pais, Cíntia Cristina de Arêdes Diniz e Edvaldo Vieira Diniz, pelo apoio e ajuda com coletas em saída de campo, pela paciência e por acreditarem no meu empenho e esforço, Karolinne Arêdes Diniz, minha irmã, pelo apoio e incentivo, e minha avó, Nely Maria das Dores Arêdes, por sempre ter acreditado na minha vontade de ser biólogo desde que era criança. Por último, mas não menos importante, dedico este trabalho a minha amiga, companheira, meu amor, Cristiane Pires Porto Barbosa, por ter vibrado, passado dificuldade e me motivado ao longo de toda a trajetória dessa experiência. Sem vocês, minha trajetória teria sido muito mais árdua, na ciência, assim como na vida, nada se faz sem o apoio e carinho de pessoas ao nosso redor.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de prestar meu agradecimento ao CEUB por ceder os laboratórios e espaços necessários para a realização deste trabalho, assim como a oportunidade de poder participar de um projeto de iniciação científica por meio dos editais publicados pela instituição, à FAPDF por conceder o financiamento auxiliando com obtenção de materiais e equipamentos, ao doutorando Carlos Vidigal por ajudar na identificação de algumas amostras de Líquen via iNaturalist e por último mas não menos importante, à toda equipe do Labocien (CEUB) por todo o apoio, confiança e paciência.

*Com grandes poderes vêm grandes responsabilidades.*

Tio Ben.

## RESUMO

Um dos maiores desafios no que tange a saúde pública em aspecto global é a crise antibiótica, pois existe uma vasta literatura científica acerca de tal problemática onde autoridades no assunto afirmam ser uma questão de urgência, caso contrário o cenário futuro não é otimista e promissor para a humanidade neste sentido. Ciente deste obstáculo, pesquisadores de diversas áreas investiram e pesquisaram nesta problemática, onde muitos trabalhos realizados demonstram a existência de organismos que possuem alguma propriedade antimicrobiana contra patógenos de interesse médico, e dentre tais organismos, os líquens são um grupo alvo de estudos atrelados a tal questão. Já existem pesquisas demonstrando a propriedade antimicrobiana que esses seres apresentam. Sendo assim, o presente trabalho buscou investigar o potencial antimicrobiano de extratos de líquens oriundos do Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek contra três bactérias patogênicas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Foram desenhadas duas metodologias para a execução dos experimentos (nomeadas como M1 e M2), as duas orbitam ao redor de um ponto central: a aplicação dos extratos contra colônias das bactérias supracitadas sobre discos de difusão. A semeadura dos inóculos bacterianos foi feita em placas de petri com meio de cultura Mueller-Hinton. Foi possível observar a formação de halos, indicando sensibilidade das bactérias contra o extrato. Das 17 amostras coletadas, três apresentaram resultados interessantes, sendo elas as amostras LC11, LC12 e LC17, contra *S.aureus*, *E.coli* e *E.faecalis* respectivamente. Interessante destacar que todas as amostras coletadas possuíam uma morfologia foliosa. Das três amostras de interesse, LC11 foi submetida à metodologia M1 e LC12 e LC17 à M2, dentre elas, o halo mais marcante e notório foi o do extrato obtido de LC11 contra *S.aureus*. A partir dos resultados obtidos ao longo deste trabalho, o Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek pode ser considerado um local portador de uma comunidade líquênica de interesse para futuros estudos com enfoque na problemática envolvendo a crise antibiótica.

**Palavras-chave:** líquens; extratos; bactérias patogênicas; antimicrobianos

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

Figura 1 - Mapa de localização das amostras coletadas e o tipo de metodologia aplicada em cada uma.....	14
Figura 2 - Esquema ilustrado das etapas referentes à M1.....	16
Figura 3 - Esquema ilustrado das etapas referentes à M2.....	17
Figura 4 - Mapa de localização das amostras que demonstraram potencial antimicrobiano contra as colônias de bactérias patogênicas.....	22
Figura 5 - Foto dos halos de resistência formados pelos extratos de líquens.....	23
Figura 6 - Foto dos halos de resistência formados por LC11 contra S.aureus na placa C) e halos formados por LC17 contra E.faecalis na placa D).....	24
Figura 7 - Gráfico de boxplot.....	27

## TABELAS

Tabela 1 - Tabela demonstrando a metodologia que cada amostra apresentou, o tipo de morfologia, se apresentou algum potencial antimicrobiano e o tipo de bactéria na qual esse potencial foi observado. N/A é lido como nulo.....	22
Tabela 2 - Tabela demonstrando os dados acerca da metodologia, conteúdo do extrato no disco e o diâmetro do halo de resistência apresentado.....	24
Tabela 3 - Tabela mostrando a morfologia, massa, coordenadas e o tipo de substrato em que cada uma das amostras coletadas encontrava-se.....	25
Tabela 4 - Tabela exibindo os valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e tamanho amostral (n) para a análise descritiva geral da massa das amostras.....	27
Tabela 5 - Tabela exibindo os valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e tamanho amostral (n) para a análise descritiva das amostras que foram submetidas a metodologia M1.....	27
Tabela 6 - Tabela exibindo os valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e tamanho amostral (n) para a análise descritiva das amostras que foram submetidas a metodologia M2.....	28

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 Resistência Antimicrobiana (RAM).....	12
2.2 Antibióticos e microrganismos.....	13
2.3 Líquens e seu potencial antimicrobiano.....	14
<b>3. MÉTODO.....</b>	<b>14</b>
3.1 Coleta e caracterização das amostras.....	14
3.2 Execução das metodologias M1 e M2.....	16
3.3 Cultivo das bactérias e seleção do meio de cultura.....	19
3.4 Investigação estatística.....	20
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Análise de resultado das metodologias M1 e M2.....	21
4.2 Identificação de LC11, LC12 e LC17.....	24
4.3 Análise estatística.....	25
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Líquens são organismos intrigantes e fascinantes, muitas vezes confundidos como sendo apenas fungos, entretanto esse é um grande equívoco. Esses seres podem ser definidos como um complexo simbiótico entre fungos (chamados de micobionte), cianobactérias e/ou algas verdes ambas chamadas de fotobionte (Kranner; Beckett; Varma, 2002), são conhecidas mais de 13 mil espécies de líquens, embora estima-se que existam bem mais (Evert; Eichhorn, 2014). Para alguns autores, a denominação de relação simbiótica é errônea em certos casos, alguns a enxergam como uma espécie de “parasitismo controlado” onde os fotobiontes sofrem uma pressão fisiológica e de desenvolvimento por parte dos micobiontes (Richardson, 1999).

Esses organismos desenvolvem-se em diversos tipos de substratos, que vão desde rochas; troncos mortos; solo; folhas; galhos de árvores (onde atuam como epifíticos) e etc, eles se apresentam em três morfologias principais: crostosos, fruticosos e foliosos (Nayaka, 2014). Quando observamos a questão da obtenção e manutenção da dieta desses indivíduos, nota-se uma relação onde o micobionte se beneficia da atividade fotossintética do fotobionte, em que podemos fazer uma analogia de “domesticação”, entretanto, existem sim alguns gêneros de algas como *Trentepohlia*, *Phycopeltis* e *Cephaleuros* onde esse processo é diferente e as algas podem ocorrer em vida livre ou liquenizadas (Sanders, 2001).

Uma questão importante quando tratamos em especial da sistemática de líquens (como já dito, são mais de 13 mil espécies conhecidas), é de que sua identificação é feita na maioria das vezes analisando o micobionte, a vasta maioria desses organismos pertence ao filo Ascomycota (Nash, 2008). A aplicabilidade e estudos de líquens é algo diverso que vai desde o biomonitoramento da qualidade do ar (Koch *et al.*, 2018; Paoli *et al.*, 2019; Santos; Vitorino; Cruvinel, 2022), tingimento (Kaushik; Giri, 2020), até o uso de seus compostos como agentes antimicrobianos (Burkholder, 1944), e esse último tópico é o responsável por guiar este projeto. Desde o descobrimento da penicilina como uma ferramenta antibiótica, a humanidade progrediu grandemente no combate aos diversos tipos de microrganismos que afligem nossa saúde e bem estar, produzimos diversos antibióticos em larga escala ao longo do tempo. Entretanto, os microrganismos também mudaram, se tornaram mais resistentes a esses medicamentos, e vem se transformando numa questão importante de saúde pública mundial (Wang *et al.*, 2018).

A resistência antimicrobiana é reconhecida como uma ameaça pública com urgência cada vez maior (Nieuwlaat *et al.*, 2020). Trata-se de um problema mundial que ocorre quando as bactérias não reagem ao tratamento antimicrobiano. Estima-se que até o ano de 2050, 10 milhões de mortes ocorram em função disso, e uma perda econômica de cerca de US \$100 bilhões.

Dentre os diversos microrganismos conhecidos pela humanidade, este trabalho teve foco em 3 deles, os quais já são bem estudados e conhecidos além de serem de interesse médico, são eles: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. A *E. coli* é um microrganismo amplamente conhecido e desempenha um papel importante em nossas vidas, ela é normalmente encontrada em nosso trato gastrointestinal e desempenha uma relação ecológica de caráter simbiótico conosco, entretanto, também pode ser considerada um organismo oportunista uma vez que pode vir a colonizar locais diferentes em nosso organismo (Price *et al.*, 2017). Essas *E. coli* que atuam como patógenos são conhecidas também como extraintestinais, e comumente são responsáveis por causar infecções do trato urinário (Johnson; Russo, 2002), meningites em neonatais, pneumonia, dentre outras doenças (Smith; Fratamico; Gunther, 2007).

Do mesmo modo, *S. aureus* também é um microrganismo de grande importância médica e de elevada virulência, ela é responsável por ocasionar infecções na pele, abscessos, além de também de atuar como uma agente causal da pneumonia, atualmente *S. aureus* é um organismo muito estudado em quesitos acerca de seus mecanismos de atuação contra o sistema imune, processos infecciosos, genética dentre outros (Cheung; Bae; Otto, 2021). *E. faecalis* também é uma bactéria oportunista que é responsável por desencadear, assim como *E. coli*, infecções do trato urinário (ITUs), meningites e outras patologias (John; Carvalho, 2011), uma questão interessante acerca de *E. faecalis* é a sua resistência antibiótica adquirida através de biofilmes por meio de conjugação com outros microrganismos e ao longo dos anos essa bactéria vem ganhando uma notória resistência antibiótica (Dale *et al.*, 2015).

É estando ciente da biologia, virulência, ampla resistência antibiótica e da fisiologia dos referidos microrganismos, que a investigação de métodos para seu combate é de extrema necessidade, quanto mais esforços e pesquisas visando o combate desses patógenos, maior será a possibilidade de um futuro mais seguro, promissor e conseqüentemente uma melhora nos tratamentos terapêuticos. Por esta razão, a presente pesquisa visa colaborar identificando possíveis compostos e métodos que resultem em achados com efeito inibitório, extraídos de

diferentes líquens.

## OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo analisar o potencial antimicrobiano de extratos de líquens coletados no Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek contra culturas específicas de microrganismos patogênicos de interesse médico, com o intuito de colaborar para o conhecimento científico dentro do combate à crise antibiótica que enfrentamos.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Resistência Antimicrobiana (RAM)

A epidemiologia pode ser compreendida como o campo da ciência que estuda os eventos relacionados à saúde coletiva que acontecem dentro das populações humanas, e visa aplicar essa gama de conhecimentos com o intuito de controlar e lidar com problemas de saúde, que podem ir de escalas como surtos ou até mesmo pandemias (Dicker *et al.*, 2012). Quando falamos de epidemiologia e doenças infecciosas, um evento histórico inevitável de ser abordado é a gripe espanhola de 1918, esse episódio trágico da nossa história marcou a humanidade tirando milhares de vidas, e tudo isso devido um patógeno, mais especificamente o vírus influenza (Goulart, 2005). Tal ocorrido pandêmico é um exemplo da importância que a epidemiologia tem em nossas vidas, e não apenas olhando para o passado podemos ver essa importância, recentemente a pandemia ocasionada pelo coronavírus é um perfeito exemplo disso.

O fator comum entre os dois eventos citados é que ambos são consequências das chamadas doenças infecciosas, a pandemia de coronavírus em especial é oriunda, mais especificamente, do grupo de doenças denominados SARS (sigla para síndrome respiratória aguda) a qual apresenta origem zoonótica (Hu *et al.*, 2021). As patologias de origem zoonótica (ou seja, que advém de animais do meio selvagem) representam uma grande porcentagem das doenças infecciosas emergentes desde a década de 1940, e são um grande alvo de interesse e vigilância em questões de saúde pública global (Morse *et al.*, 2012).

Há mais de 20 anos, Fauci (2001) já abordava a questão das doenças infecciosas no novo século que se iniciava, em seu trabalho um tópico importante que o autor aborda é da resistência antimicrobiana, como tal questão teria um impacto grande na sociedade e não

apenas isso, mas como deveríamos lidar e sua importância em escala mundial. E bem, podemos notar que o autor não errou, mais de 2 décadas depois e infelizmente, hoje vivemos uma intensa crise mundial de resistência antimicrobiana de organismos contra diversas drogas e a tendência é que o cenário possa piorar (Windels *et al.*, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana decorre de uma dificuldade que compostos/agentes antimicrobianos apresentam em lidar com microrganismos como bactérias, fungos dentre outros (WHO, 2022).

A resistência contra antimicrobianos como beta-lactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas é um dos grandes problemas de saúde pública envolvendo especialmente, bactérias, essas em específico são chamadas de ultra resistentes ou superbactérias (Ventola, 2015; Jacome; Zubiato, 2019; Ribeiro; Santos; Sousa, 2022). Vale ressaltar que alguns fungos também se enquadram nesse tópico de “super microrganismos”, que têm resistência antimicrobiana e são de elevado interesse médico, como *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Candida albicans* dentre outros recentemente listados como fungos patogênicos de interesse médico pela OMS (WHO ANTIMICROBIAL RESISTANCE DIVISION, 2022; Anderson, 2023).

## 2.2 Antibióticos e microrganismos

Alexander Fleming (1881 – 1955) foi um cientista muito importante que mudou para sempre o rumo da humanidade, em 1928 o pesquisador escocês notou a capacidade antimicrobiana do fungo do gênero *penicillium* ao observar um halo de resistência em uma placa de cultura bacteriana. E foi graças a essa descoberta que a medicina, remédios e tratamentos médicos nunca mais foram os mesmos, a humanidade acabava de dar um grande passo rumo ao progresso, iniciou-se então a era dos antibióticos que até a atualidade são amplamente utilizados por nós (Bennet; Chung, 2001).

Entretanto, apesar da produção de antibióticos ter aumentado ao longo dos anos, um problema sério também veio se consolidando, a resistência dos microrganismos em relação a esses medicamentos, é o que os cientistas chamam de resistência antibiótica (Talebi *et al.*, 2019). Um dos fatores determinantes para o processo de aumento desenfreado de um perfil de resistência antibiótica, que muitos microrganismos adquiriram e vêm adquirindo contra diversos medicamentos, é justamente o uso indevido e indiscriminado desses fármacos (Moreira *et al.*, 2019). Tal questão veio se tornando um problema global e que em alguns

anos pode vir a ser algo perigoso para nossa sociedade, estima-se que até 2050 a mortalidade relacionada à microrganismos seja algo alarmante, isso é um tópico que as próprias entidades como os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a OMS já reconhecem e informam que medidas devem ser tomadas (Church; Mckillip, 2021).

### 2.3 Líquens e seu potencial antimicrobiano

Estando ciente da problemática de resistência antibiótica, cientistas e pesquisadores do mundo todo têm se dedicado em mudar esse possível cenário que ameaça nosso bem estar. E é aqui que os líquens entram, não é de hoje que esses organismos são estudados, na década de 40 os primeiros estudos acerca da capacidade e potencial antimicrobiano já dava seus primeiros passos (Burkholder, 1944). Essa capacidade evidenciada pelos líquens é proveniente principalmente de metabólitos secundários produzidos por eles, os quais são oriundos, em suma, dos micobiontes, podendo vir a serem utilizados também como pigmentos, inibidores enzimáticos e é claro, agentes antibióticos (Podterob, 2008; Verma; Behera, 2014; Yadav; Nayaka; Dwivedi, 2021).

Estudos já demonstraram o potencial de vários líquens contra microrganismos como *S.aureus* (Shrestha *et al.*, 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (Honda *et al.*, 2010), *Enterococcus faecium*, *E.faecalis* (Micheletti *et al.*, 2021), *C.albicans* (Nekhoroshev *et al.*, 2021). Nesse último exemplo, é interessante notar que alguns líquens apresentam também um potencial antifúngico, esse fato é curioso já que os líquens apresentam um micobionte, antifúngicos oriundos de outros fungos são uma realidade e não é de hoje.

## 3. MÉTODO

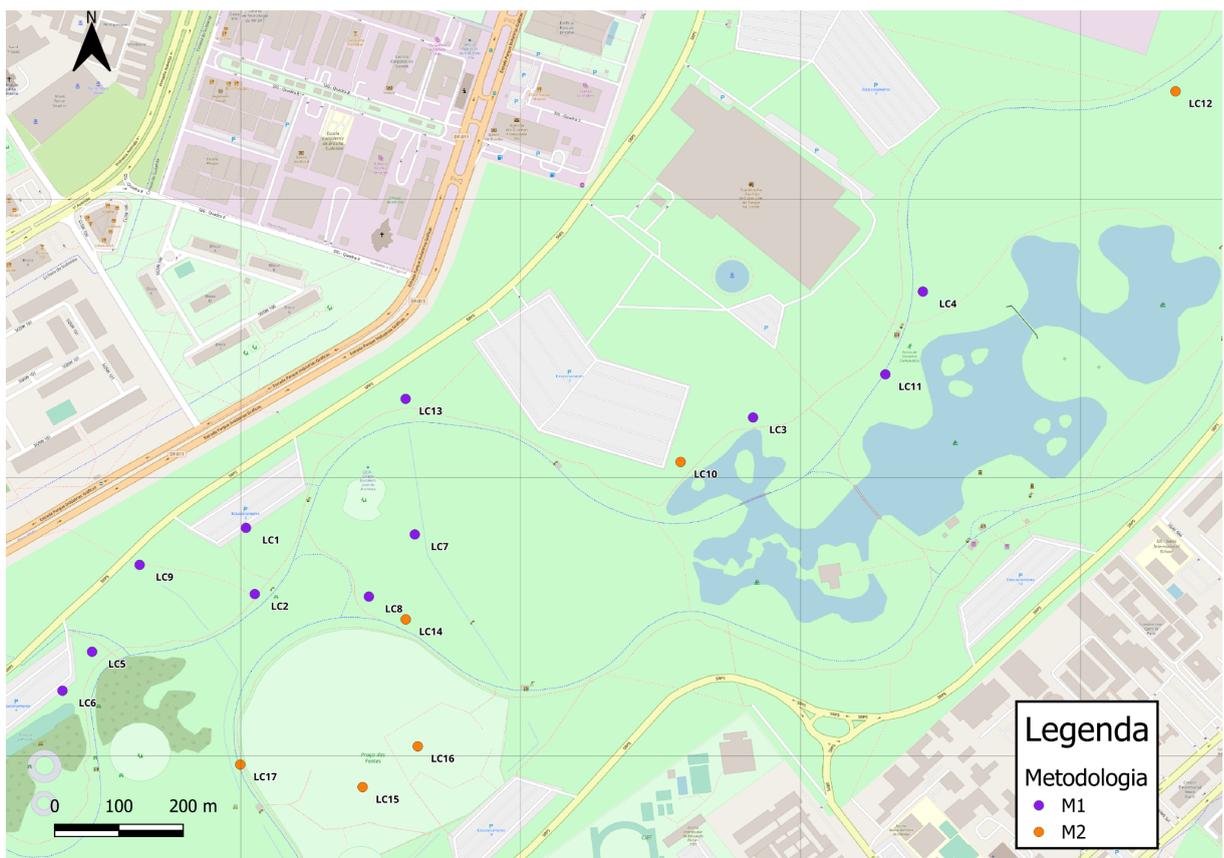
Este trabalho foi realizado no laboratório de microbiologia e de ciências naturais do Centro Universitário de Brasília (CEUB), com auxílio da equipe do Labocien do CEUB e financiado pela agência de fomento Fundação de apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

### 3.1 Coleta e caracterização das amostras

As amostras de líquens foram obtidas no Parque Dona Sarah Kubitschek de Brasília/DF, no período de Janeiro a Maio de 2023. Foram coletadas 17 espécimes de líquens, que foram submetidas a análise morfológica. As coordenadas geográficas da coleta foram

registradas e o transporte e armazenamento das amostras foi feito utilizando sacos plásticos limpos e armazenados em temperatura ambiente até o momento de realização dos experimentos. No ambiente laboratorial, a massa de cada amostra foi registrada com auxílio de balanças analíticas de precisão. Para a análise morfológica, os líquens foram classificados levando em consideração suas 3 principais morfologias (foliosos, crostoso e fruticoso). A nomenclatura de cada amostra foi dada pelo padrão de LC (abreviação do inglês, Lichen) seguido do número da amostra. Os pontos de coleta das 17 amostras podem ser observados no mapa descrito abaixo (figura 1). A coleta em campo consistiu no emprego de pequenos sacos plásticos; martelo; cinzel; celular; caderneta e canetas; tal etapa foi realizada baseada e adaptada de Nayaka (2014).

**Figura 1** - Mapa de localização das amostras coletadas e o tipo de metodologia aplicada em cada uma. M1 representando a metodologia 1 criada para a execução deste trabalho, e M2 representando a metodologia M2.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

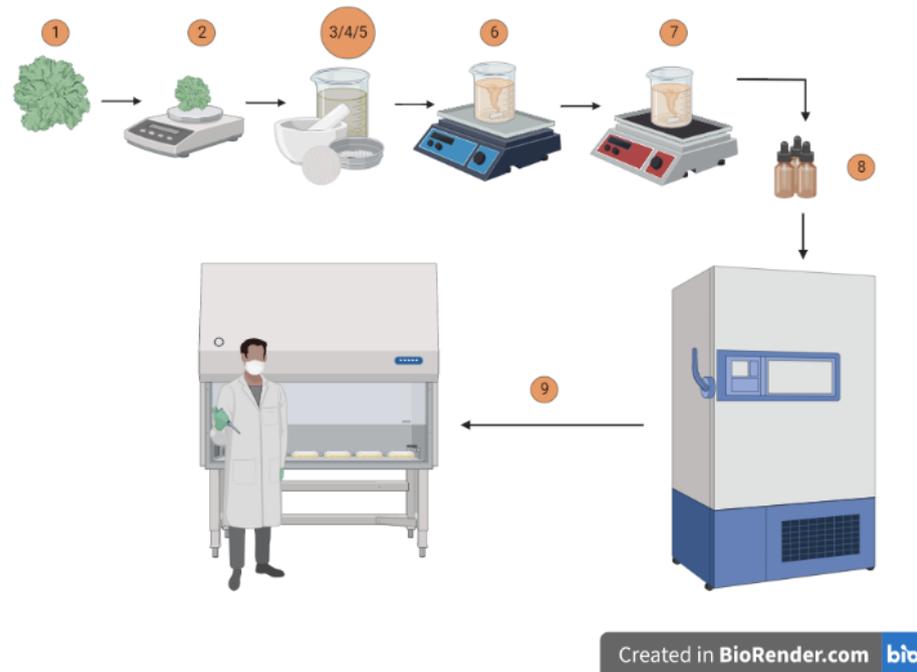
### 3.2 Execução das metodologias M1 e M2

Para este projeto foram elaboradas 2 metodologias, a primeira sendo chamada de M1 e a segunda como M2. Ambas apresentam um pilar comum que as norteia, no caso elas se pautam essencialmente na obtenção do extrato de líquens através de sua maceração em solvente acetona, seguida de ressuspensão em água destilada. Esse é o procedimento comum entre elas. Uma vez que o extrato de líquen é obtido a partir da incubação com a acetona seguido de água destilada, eles eram aplicados em discos estéreis contra colônias de 3 bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) a fim de observar se haveria a formação de halos de resistência pela difusão dos extratos nos discos.

A primeira metodologia construída e aplicada nos experimentos (nomeada de M1) inicia-se com a coleta em campo das amostras de líquens, com cada uma delas devidamente coletada e armazenada, no dia seguinte, já dentro de ambiente laboratorial, elas foram pesadas e suas massas devidamente registradas para imediatamente após, dar início à maceração das amostras no cadinho e pistilo. Para as amostras de M1 foram todas como já citado, submetidas à maceração em 20 mL de acetona. Com a amostra já bem macerada, o extrato bruto inicial foi filtrado inicialmente despejado em 2 pequenas peneiras de Nylon diretamente em um béquer, esse primeiro filtrado era então submetido à uma segunda filtração, porém dessa vez utilizando papel filtro. Após a filtração estar completa, o extrato foi conduzido à aquecimento e homogeneização em um agitador magnético até que começasse a ebulir, é importante salientar que nenhum extrato seja qual for a metodologia aplicada, foi aquecido até sua total ebulição.

O ulterior procedimento foi o de ressuspensão e concomitante homogeneização em outro agitador magnético, uma vez que o extrato já estivesse bem homogeneizado ele foi então transportado para um pote âmbar e armazenado em uma geladeira. Cada uma das etapas descritas aqui podem ser vistas mais didaticamente na ilustração abaixo (figura 2).

**Figura 2** - Esquema ilustrado das etapas referentes à M1. 1) Coleta em campo das amostras; 2) Pesagem em balança de precisão analítica; 3) Maceração em acetona utilizando cadinho e pistila; 4) Filtração utilizando 2 peneiras de Nylon pequenas; 5) Filtração utilizando papel filtro; 6) Aquecimento do filtrado em agitador magnético; 7) Ressuspensão em água destilada e homogeneização em agitador magnético; 8) Armazenamento do extrato final em potes âmbar dentro de geladeira; 9) Aplicação do extrato obtido nas placas colonizadas pelas bactérias selecionadas.



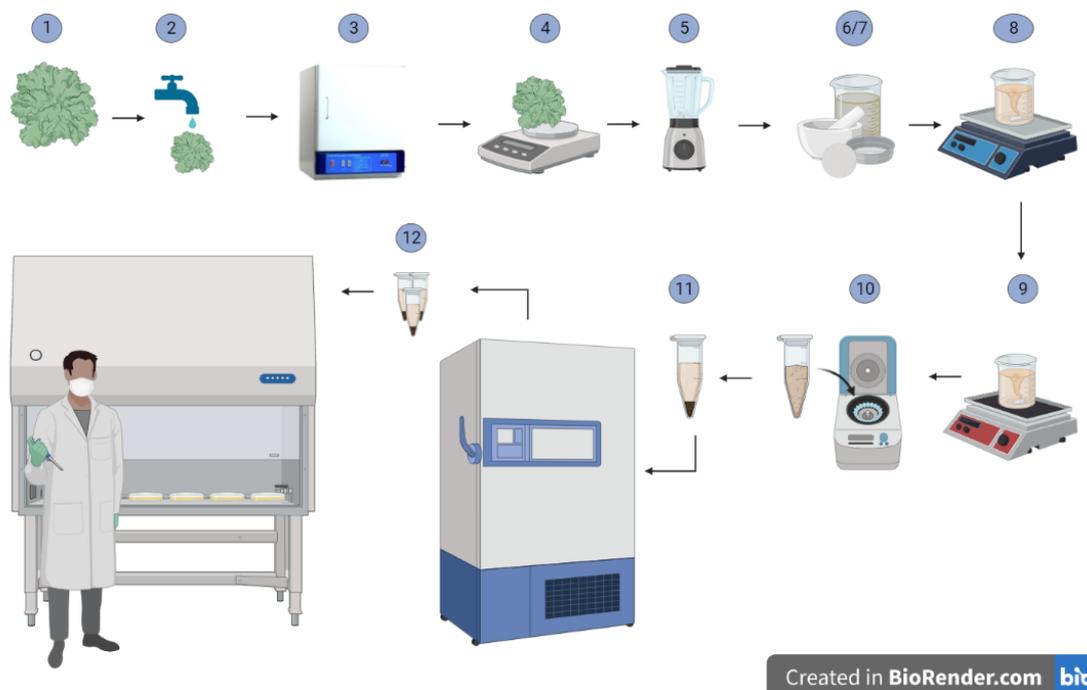
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Do mesmo modo que M1, a segunda metodologia desenvolvida neste trabalho, nomeada como M2, não apresentou qualquer diferença no modo de coleta em campo nem no tipo de material utilizado. No dia posterior à coleta, os líquens foram levados para laboratório onde de fato o experimento foi iniciado. Com as amostras em mão é feita uma lavagem superficial e breve com água corrente para retirar sujeiras e insetos, com isso elas são então armazenadas em uma estufa por 24h sob 30°C para sofrer desidratação.

Após essas 24h dentro da estufa, os líquens agora ressecados são pesados e suas respectivas massas registradas, com isso, o processo de trituração inicial utilizando um mini liquidificador é iniciado. A trituração é feita até a amostra adquirir um aspecto parecido ao de pó. Essa amostra triturada foi então adicionada ao cadinho e pistilo e despejada acetona na razão de 1:10 (g/mL de acetona), com isso ela era macerada bem. Subsequente à maceração, o extrato bruto inicial era despejado em um funil com papel filtro para um béquer, esse extrato na vidraria foi colocado sobre um agitador magnético onde era aquecido até que começasse a ebulir.

Com o produto resultante da parcial ebulição do extrato, adicionou-se água destilada para ressuspensão do mesmo, essa etapa segue a razão de acetona-água destilada em 19:4 ( $\text{mL}_{\text{acetona}} / \text{mL}_{\text{água destilada}}$ ), a ressuspensão ocorreu em um outro agitador magnético até que o extrato estivesse bem homogeneizado. Logo após o término da homogeneização em agitador magnético, o extrato era adicionado em um tubo Eppendorf (com capacidade para 2 mL) e colocado em uma centrífuga (Eppendorf SE 5427 R) sob 5000 rpm durante 5 minutos. Por fim, o sobrenadante obtido após a centrifugação era armazenado em tubos Eppendorfs separados em uma geladeira para posterior aplicação nas colônias de bactérias. As etapas de todo o processo vinculado à M2 podem ser visualizadas no seguinte esquema abaixo (figura 3).

**Figura 3** - Esquema ilustrado das etapas referentes à M2. 1) Coleta em campo das amostras; 2) Lavagem em água corrente; 3) Desidratação em estufa sob 30 graus C por 24h; 4) Pesagem em balança de precisão analítica; 5) Trituração utilizando liquidificador portátil; 6) Maceração em acetona utilizando cadinho e pistila; 7) Filtração utilizando papel filtro; 8) Aquecimento do filtrado em agitador magnético até ebulição; 9) Ressuspensão em água destilada e homogeneizado em agitador magnético; 10) Centrifugação do extrato em minicentrífuga; 11) Armazenamento do extrato final em eppendorfs dentro de geladeira; 12) Aplicação do extrato obtido nas placas colonizadas pelas bactérias selecionadas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Vale destacar alguns pontos importantes dentro das metodologias criadas para a execução dos experimentos deste projeto, sendo o primeiro deles a razão entre o uso dos

solventes pela massa da amostra utilizada. Para as amostras de número um até a de número nove (submetidas à M1), primeiramente foi adicionado 20 mL de acetona, e, posteriormente para o processo de ressuspensão, 20 mL de água destilada, desprezando o fator massa da amostra (vale salientar que os solventes foram adicionados em momentos diferentes). Para as amostras de número 10 até a 17, foi estabelecido a razão de 1:10 quanto ao uso de acetona (essa razão para ambas as metodologias), ou seja, a cada 1 grama de amostra utilizada, foi aplicado 10 mL de acetona.

Quanto à água destilada necessária para o processo de ressuspensão, a razão levou em consideração a quantidade de acetona previamente utilizada e não a massa da amostra, para cada 19 mL de acetona, aplicou-se 4 mL de água destilada. Essa razão foi empregada visando obter um extrato mais concentrado e forte, de modo que as moléculas e substâncias não se perdessem na ressuspensão do extrato. Ressalta-se que para a M2, foi aplicada apenas essa segunda razão entre a amostra-solvente (1:10) e solvente-solvente (19:4). O segundo ponto importante que deve ser destacado é de que foram utilizados dois agitadores magnéticos diferentes, um para aquecimento e outro somente para a homogenizar em ressuspensão em água destilada. Nos dois procedimentos a homogeneização foi realizada com um imã ("bailarina").

### 3.3 Cultivo das bactérias e seleção do meio de cultura

Foram utilizadas 3 espécies bacterianas de interesse médico: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A bactéria foi cultivada em meio de cultura Agar Mueller-Hinton (KASVI). O preparo do meio de cultura foi realizado seguindo as instruções do fabricante e adaptadas para a realidade do projeto. Para isso, cada amostra de suspensão bacteriana foi semeada em placas de petri contendo o meio de cultura Agar Mueller-Hinton com o auxílio de swabs e alça bacteriológica (o uso de swabs ou alças foi determinado pela disponibilidade de um ou outro durante a execução do experimento no dia, dando preferência ao uso de swabs quando disponíveis). Em seguida, foram adicionados discos de papel filtro estéreis em meio de cultura com as respectivas bactérias semeadas, para então adicionar 10 microlitros ( $10\mu\text{L}^{\text{extrato}}/20\text{ mL}^{\text{meio de cultura}}$ ) dos extratos de líquens. As análises foram feitas em triplicata para cada extrato de líquen. Por fim, as amostras foram incubadas em estufa a 30°C por 24h.

### 3.4 Investigação estatística

Para a parte de análise estatística inferencial deste projeto foi determinado realizar a comparação entre as médias das massas das amostras de líquen coletadas levando em consideração a metodologia aplicada nas amostras. Em um primeiro momento, foi realizado um processamento dos dados para determinação de valores de estatística descritiva. Para as análises realizadas foi utilizado o software RStudio (v4.2.2).

Inicialmente, para uma análise descritiva geral da massa das amostras de líquens coletadas foram considerados os valores de média, desvio padrão e variância dos dados obtidos (esse procedimento foi feito utilizando o pacote DescTools para RStudio). Partindo posteriormente para a análise estatística inferencial dos dados coletados, a investigação se fundamentou em verificar a média das massas entre as amostras elencando-as de acordo com a metodologia às quais foram submetidas. Assumindo como hipótese nula ( $H_0$ ) que as médias entre as massas para M1 e M2 não diferem, e instituindo um valor de significância como  $\lambda = 0,05$ , podemos estabelecer a seguinte relação:

$H_0 : \mu_{M1} = \mu_{M2}$  (a hipótese nula afirma que as médias não diferem).

$H_A : \mu_{M1} \neq \mu_{M2}$  (a hipótese alternativa afirma que as médias diferem).

Para a análise desse conjunto de dados, foi inicialmente estabelecido executar um teste  $t$  de student (ou teste  $t$  para duas amostras independentes). A normalidade dos dados obtidos foi a primeira premissa testada, para essa etapa foi aplicado o teste Shapiro-Wilk de normalidade, onde foi constatado que para as amostras de M1 não existe normalidade, por mais que M2 tenha atendido à premissa, foi necessário realizar uma transformação de dados equivalente para ambos. Foi aplicada uma transformação logarítmica.

Com os dados transformados usando uma base logarítmica e, novamente realizando um teste de normalidade de Shapiro-Wilk, foi atingida a normalidade para todo o conjunto. Em seguida foi averiguada se a segunda premissa (no caso, de homocedasticidade das variâncias) seria correspondida. Confirmou-se que a segunda premissa do teste era inconsistente, desse modo, foi substituído o teste a ser aplicado na análise para um teste  $t$  de Welch.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise de resultado das metodologias M1 e M2

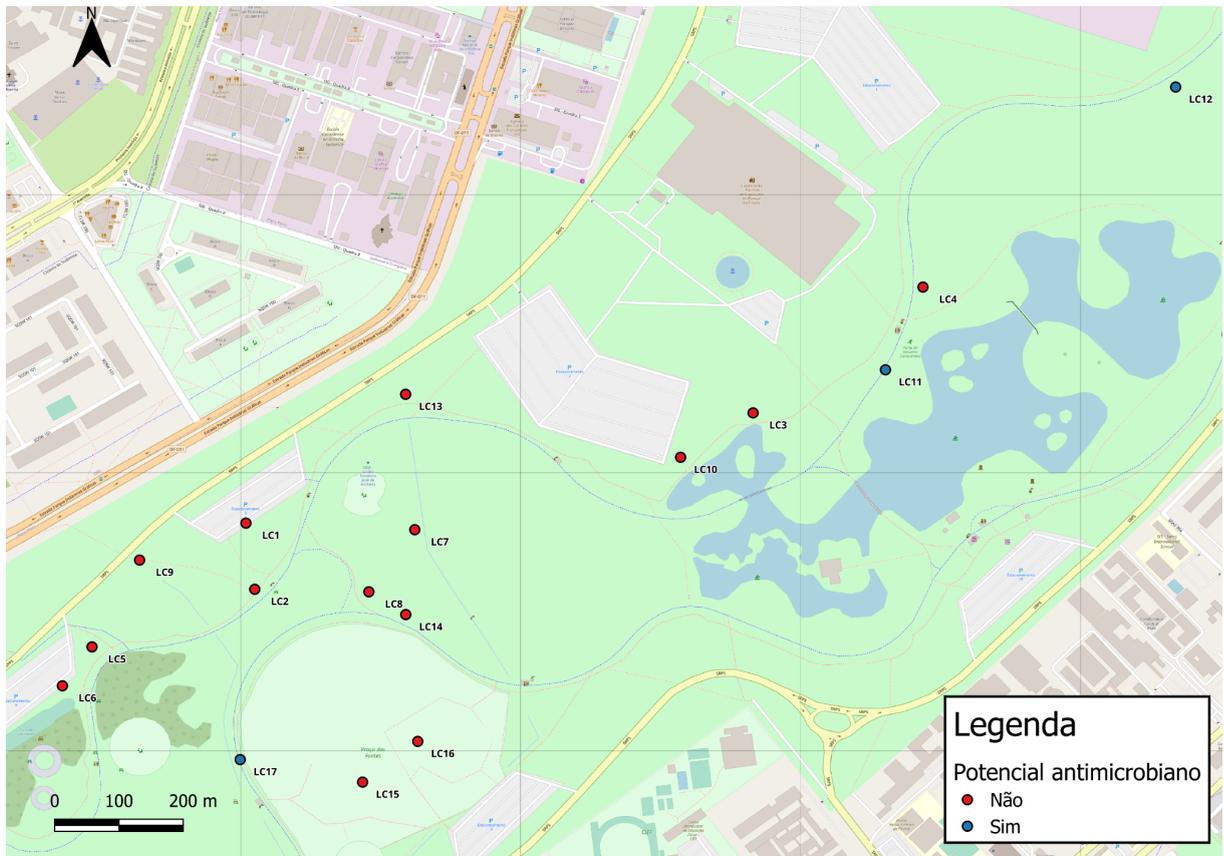
Como proposto pelo pilar comum entre as metodologias desenhadas para este projeto, os extratos obtidos foram aplicados em culturas bacterianas de *E.coli*, *S.aureus* e *E.faecalis*, onde 10 µL de cada extrato foi adicionado em discos estéreis (autoclavados) para observar se ocorreria formação de halos de resistência através da difusão do extrato no disco para o meio de cultura colonizado. O potencial que cada amostra apresentou contra determinada bactéria pode ser visualizada na tabela (tabela 1) e mapa abaixo (figura 4).

**Tabela 1** - Tabela demonstrando a metodologia que cada amostra apresentou, o tipo de morfologia, se apresentou algum potencial antimicrobiano e o tipo de bactéria na qual esse potencial foi observado. N/A é lido como nulo.

ID	Morfologia	Metodologia	Potencial	Bactéria
LC1	Folioso	M1	Não	N/A
LC2	Folioso	M1	Não	N/A
LC3	Folioso	M1	Não	N/A
LC4	Folioso	M1	Não	N/A
LC5	Folioso	M1	Não	N/A
LC6	Folioso	M1	Não	N/A
LC7	Folioso	M1	Não	N/A
LC8	Folioso	M1	Não	N/A
LC9	Folioso	M1	Não	N/A
LC10	Folioso	M2	Não	N/A
LC11	Folioso	M1	Sim	<i>S.aureus</i>
LC12	Folioso	M2	Sim	<i>E.coli</i>
LC13	Folioso	M1	Não	N/A
LC14	Folioso	M2	Não	N/A
LC15	Folioso	M2	Não	N/A
LC16	Fruticoso	M2	Não	N/A
LC17	Folioso	M2	Sim	<i>E.faecallis</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

**Figura 4** - Mapa de localização das amostras que demonstraram potencial antimicrobiano contra as colônias de bactérias patogênicas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para os líquens submetidos à M1, apenas o espécime LC11 apresentou um nítido e marcante halo (cerca de 20 mm de diâmetro) contra *S.aureus*, ciente da formação desse grande halo, o extrato em questão foi reaplicado novamente em placas colonizadas com a mesma bactéria. Na segunda aplicação também surgiram halos porém mais sutis. A placa onde ocorreu a primeira aplicação do extrato de LC11 demonstrou um halo notório e um outro que não apresentou um halo perfeito, isso devido ao fato de que a colônia bacteriana liberou muita água durante sua incubação, o que fez com que o extrato se espalhasse e formasse um segundo halo mais amorfo no canto esquerdo da placa de petri.

Para a segunda aplicação do extrato de LC11 (que ocorreu uma semana após), houve a formação de um halo na parte inferior da placa (com diâmetro aproximado de 20 mm) e outro bem menos expressivo no canto direito (ele foi desprezado). Já para os líquens sujeitos à M2, dois extratos apresentaram um halo de resistência, LC12 e LC17, respectivamente contra *E.coli* e *E.faecalis*, diferente do halo formado por LC11, os halos formados por tais amostras foram mais sutis. LC12 formou um halo na parte superior da placa (com um

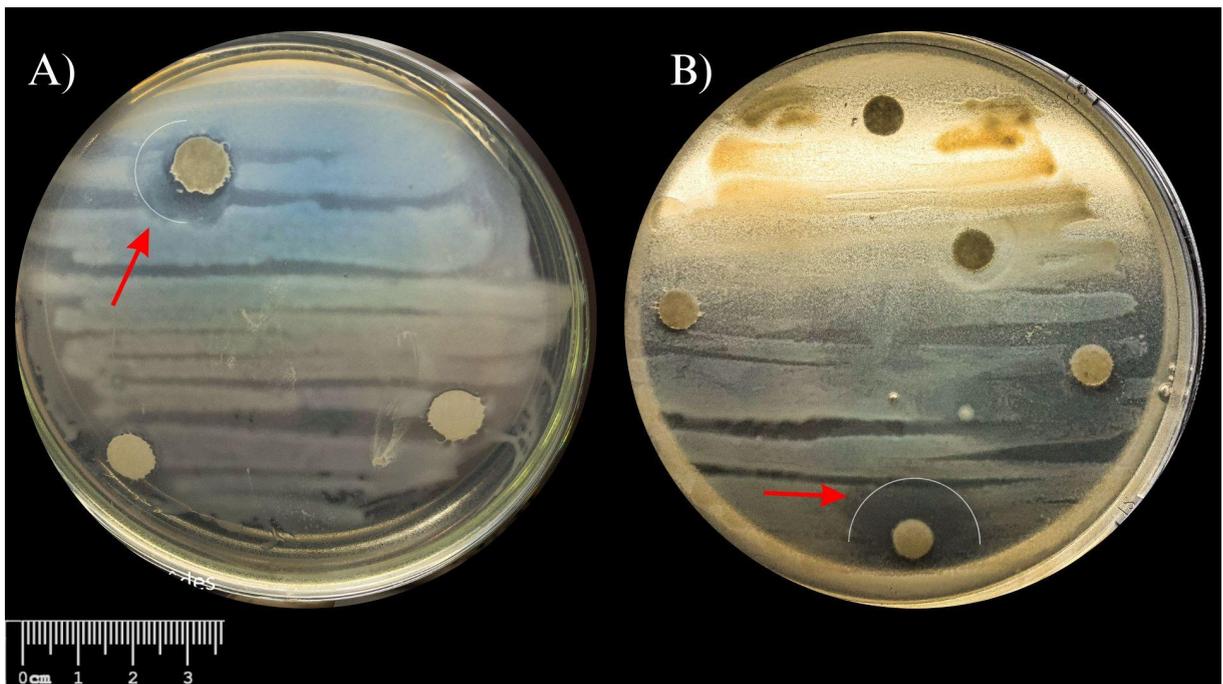
diâmetro aproximado de 15 mm), e, LC17 apresentou um único halo pequeníssimo (menos de 1 mm de diâmetro). A tabela a seguir demonstra essa relação dos halos de resistência (tabela 2), os registros feitos podem ser visualizados também a seguir (figura 5).

**Tabela 2** - Tabela demonstrando os dados acerca da metodologia, conteúdo do extrato no disco e o diâmetro do halo de resistência apresentado.

Amostra	Metodologia	Conteúdo no disco (extrato)	Diâmetro do Halo de inibição (mm)
LC11	M1	10 µL	20
LC12	M2	10 µL	15
LC17	M2	10 µL	< 1

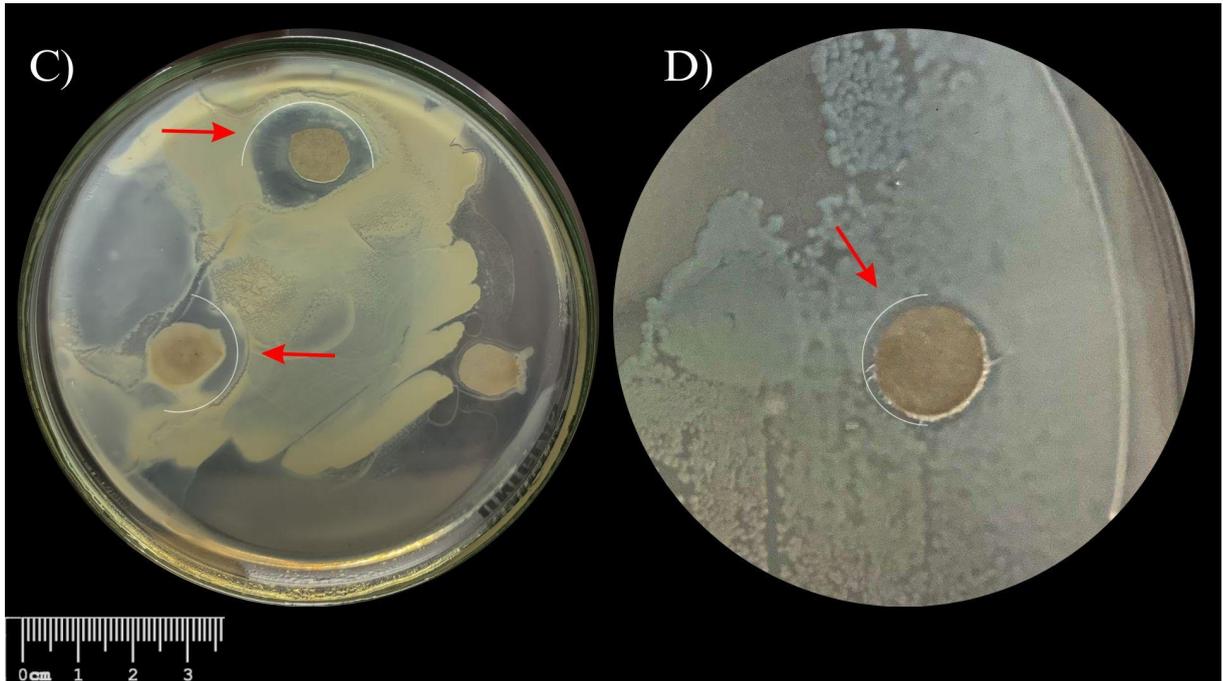
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

**Figura 5** - Foto dos halos de resistência formados pelos extratos de líquens. Abaixo a placa A) demonstra um halo formado por LC12 contra *E.coli*. A placa B) apresenta um halo formado pelo extrato de LC11 contra *S.aureus*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

**Figura 6** - Foto dos halos de resistência formados por LC11 contra *S.aureus* na placa C) e halos formados por LC17 contra *E.faecalis* na placa D).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

#### 4.2 Identificação de LC11, LC12 e LC17

Para a identificação morfológica dos líquens que apresentaram potencial antimicrobiano, foi utilizado a plataforma iNaturalist, com ajuda de um especialista na área a identificação foi mais precisa. [Carlos Vidigal](#) foi o doutorando responsável pela identificação dessas amostras através da plataforma. Foi observado uma predominância de líquens de morfologia foliosa (tabela 3) e presentes em um substrato vegetal, no caso, troncos árvores. Houve uma única exceção dentro das 17 amostras, LC16 é um líquen do tipo fruticoso e foi encontrado em uma palmeira.

**Tabela 3** - Tabela mostrando a morfologia, massa, coordenadas e o tipo de substrato em que cada uma das amostras coletadas encontrava-se. Nota-se uma predominância de líquens foliosos e de substrato do tipo árvore.

ID	Morfologia	Massa (g)	Long	Lat	Substrato
LC1	Folioso	0.30	-47.916244	-15.801812	Árvore
LC2	Folioso	0.33	-47.916116	-15.802779	Árvore
LC3	Folioso	0.31	-47.908876	-15.800200	Árvore
LC4	Folioso	0.20	-47.906408	-15.798361	Árvore
LC5	Folioso	0.33	-47.918480	-15.803621	Árvore
LC6	Folioso	0.17	-47.918910	-15.804190	Árvore
LC7	Folioso	1.58	-47.913791	-15.801908	Árvore
LC8	Folioso	1.16	-47.914458	-15.802816	Árvore
LC9	Folioso	1.84	-47.917789	-15.802352	Árvore
LC10	Folioso	1.55	-47.909929	-15.800849	Árvore
LC11	Folioso	1.90	-47.906953	-15.799570	Árvore
LC12	Folioso	0.75	-47.902737	-15.795436	Árvore
LC13	Folioso	2.7	-47.913924	-15.799928	Árvore
LC14	Folioso	0.98	-47.913922	-15.803149	Árvore
LC15	Folioso	0.88	-47.914549	-15.805598	Árvore
LC16	Fruticoso	0.90	-47.913748	-15.805003	Palmeira
LC17	Folioso	1.10	-47.916327	-15.805269	Árvore

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2023)

#### 4.3 Análise estatística

Para a análise estatística descritiva obteve-se dados referentes à média, desvio padrão e variância, onde primeiramente foi realizado para determinar esses valores para todas as amostras (tabela 4) e em seguida, para as amostras divino-às baseado na metodologia que cada uma foi submetida, M1 (tabela 5) e M2 (tabela 6).

**Tabela 4** - Tabela exibindo os valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e tamanho amostral (n) para a análise descritiva geral da massa das amostras.

<b>Parâmetro: Massa (g)</b>	<b>Valor</b>
$\bar{x}$	0.999
$\sigma$	0.723
$\sigma^2$	0.724
n	17

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2023)

**Tabela 5** - Tabela exibindo os valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e tamanho amostral (n) para a análise descritiva das amostras que foram submetidas a metodologia M1.

<b>M1</b>	
<b>Parâmetro: Massa (g)</b>	<b>Valor</b>
$\bar{x}$	0.983
$\sigma$	0.892
$\sigma^2$	0.795
n	11

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2023)

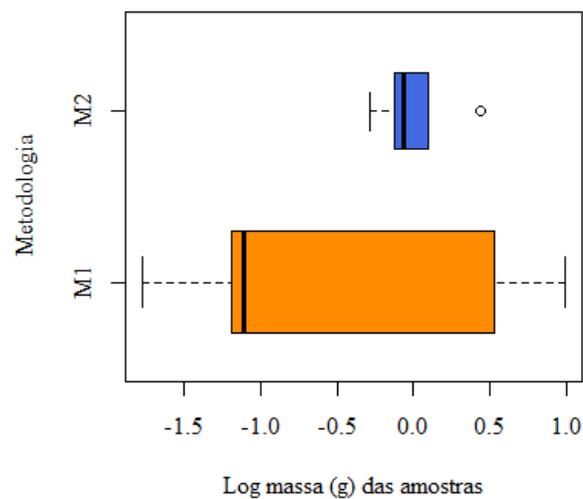
**Tabela 6** - Tabela exibindo os valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e tamanho amostral (n) para a análise descritiva das amostras que foram submetidas a metodologia M2.

M2	
Parâmetro:	Valor
Massa (g)	
$\bar{x}$	1.026
$\sigma$	0.281
$\sigma^2$	0.079
n	6

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Após a execução do teste *t* de Welch a hipótese nula previamente levantada ganhou suporte. Com esse validação, pode-se inferir que não há diferença estatística (figura 6) entre as médias da massa das amostras submetidas à metodologia M1 e M2 ( $\alpha = 0,05$ ; Teste *t* de Welch para duas amostras;  $t = -1,42$ ;  $df = 11,99$ ;  $p\text{-valor} > 0,05$ ).

**Figura 7** - Gráfico de boxplot mostrando a relação da massa das amostras em função da metodologia empregada, após a transformação dos dados em escala logarítmica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

## 5. DISCUSSÃO

A crise global da escassez de antibióticos efetivos contra os mais variados organismos patogênicos é um problema atual e que tende a escalonar e se tornar em um futuro não muito distante, uma das maiores questões de saúde pública em todo o mundo. É ciente dessa problemática que pesquisadores e pesquisadoras ao redor do planeta, dos mais diversos campos da ciência, se empenham para buscar soluções sejam elas novos compostos, métodos, fármacos dentre outros. E dentre os compostos que são estudados, os extratos de líquens há um bom tempo se enquadram nesse cenário, sendo um dos primeiros registros acerca de suas propriedades há mais de 7 décadas (Burkholder, 1944).

Dentre os líquens que demonstraram potencial antimicrobiano contra as bactérias patogênicas selecionadas para este projeto, LC12 e LC17, identificados como pertencentes ao gênero *Parmotrema*, o qual é amplamente estudado no que tange em especial as propriedade de seus extratos e compostos/moléculas acerca de propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, combate a patógenos de plantas e até estudos associados à poluição atmosférica sobre sua fisiologia (Pradhan *et al.*, 2022; Tuan *et al.*, 2020; Bogo *et al.*, 2020; Tartouga *et al.*, 2022; Saha; Pal; Paul; 2021; Santos *et al.*, 2022). O gênero também é um grande portador de fungos endoliquênicos (Chakarwanti; Nayaka; srivastava, 2020). LC11, pertencente ao gênero *Canoparmelia*, o qual também é incluído em estudos relacionados ao combate de microrganismos patogênicos, possui até mesmo trabalhos investigando sua capacidade de combate ao trematódeo *Schistosoma mansoni* (Silva *et al.*, 2021).

Este projeto teve uma predominância de líquens foliosos, sendo um total de 16 organismos com a morfologia em questão, e apenas 1 líquen apresentou morfologia diferente do restante, no caso LC16 (líquen fruticoso). Diante dos resultados apresentados ao longo deste trabalho, o que podemos inferir, que é também amplamente corroborado pela literatura, é o fato de que extratos de líquens foliosos apresentam potencial antimicrobiano, no caso deste estudo, contra *S.aureus*, *E. faecalis* e *E.coli*.

Há um necessidade em melhor avaliar os dados obtidos neste projeto, como por exemplo, averiguar se a testagem de novas concentrações para obtenção dos extratos, uso de meios de cultura alternativos, amostras com uma maior massa (como é visto na maioria da literatura científica na qual este trabalho se inspirou) e até mesmo amostras com morfologias distintas, pudessem apresentar um resultado diferente. Todas essas perguntas e

questionamentos são importantes para futuras investigações acerca da temática. Levando em consideração a realidade em que este experimento foi construído, onde tudo foi adaptado para a melhor exequibilidade e eficiência.

## **6. CONCLUSÃO**

Esta pesquisa demonstrou mérito científico pois foi possível alcançar os objetivos propostos visto que os líquens apresentaram atividade antimicrobiana. Dos 17 líquens coletados, 3 amostras demonstraram um resultado relevante, foi observado um potencial antimicrobiano dos extratos em 3 amostras bacterianas, onde cada um demonstrou a presença de um halo de resistência contra uma cultura patogênica específica, nenhuma das amostras apresentou potencial para a mesma colônia de bactéria. Sendo assim, o resultado mais notório e evidente foi do extrato do espécime LC11 (submetido à M1) contra *S.aureus*. Portanto, ciente desses resultados, pode-se inferir que diante das metodologias desenvolvidas ao longo deste projeto, o Parque da Cidade Dona Sarah Kubitschek apresenta uma comunidade líquênica que pode vir a ser de importante interesse para futuros estudos acerca dessa temática de potencial antimicrobiano.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, Tatum. Invasive fungal pathogens. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 101, n. 03, p. 166–167, 2023.
- BENNETT, J. W.; CHUNG, K. T. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. **Advances in Applied Microbiology**, v. 49, p. 163–184, 2001.
- BOGO, Danielle; HONDA, Neli Kika; ALCANTARA, Glaucia Braz; *et al.* Cytotoxic Activity of Compounds from Lichens of the Cerrado Biome in Brazil. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 12, n. 1, 2020.
- BURKHOLDER, P. R. et al. Antibiotic Activity of Lichens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 30, n. 9, p. 250–255, 1944.
- CHAKARWARTI, J. The diversity of endolichenic fungi – A review. **Asian Journal of Mycology**, v. 3, n. 1, p. 490–511, 2020.
- CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.
- CHURCH, N. A.; MCKILLIP, J. L. Antibiotic resistance crisis: challenges and imperatives. **Biologia**, v. 76, n. 5, p. 1535–1550, 2021.
- DALE, J. L. et al. Multiple roles for *Enterococcus faecalis* glycosyltransferases in biofilm-associated antibiotic resistance, cell envelope integrity, and conjugative transfer. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4094–4105, 2015.
- DICKER, R. C. et al. **Principles of Epidemiology in Public Health Practice**. 3. ed. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- FAUCI, A. S. Infectious diseases: Considerations for the 21st century. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 5, p. 675–685, 2001.
- GOULART, A. DA C. Revisitando a espanhola: a gripe pandêmica de 1918 no Rio de Janeiro. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 12, n. 1, p. 101–142, 2005
- HONDA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 328–332, 2010.
- HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 2021.
- NASH, Thomas H. **Lichen Biology**. 2. ed. [s.l.]: Cambridge University Press, 2008.
- JACOME, Mishell Poletth Ortiz; GONZALES-ZUBIATE, Fernando A. HOW TO STOP THE SPREADING OF SUPER BACTERIA? **Brasil Para Todos - Revista Internacional**, v. 7, n. 1, p. 10–14, 2019.
- JOHN, U. V.; CARVALHO, J. *Enterococcus*: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 5, p. 357–366, 2011.
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E coli*”.

**Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 3, p. 155–162, 2002.

KAUSHIK, Amrita; GIRI, Pavan Prakash. Lichens: Natural Alternatives in Textiles Finishing. *In*:

**Lichen-Derived Products: Extraction and Applications**. [s.l.]: Wiley, 2020, p. 179–187. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/9781119593249.ch7>>. Acesso em: 3 Jun. 2023.

KOCH, N. M. et al. Air quality assessment in different urban areas from Rio Grande do Sul State, Brazil, using lichen transplants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 2233–2248, 2018.

KRANNER, I.; BECKETT, R. P.; VARMA, A. K. **Protocols in Lichenology**. 1. ed. New York: Springer - Verlag, 2002.

MICHELETTI, A. C. et al. Antibacterial potencial of 12 lichen species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, p. 1–11, 2021.

MOREIRA, M. D. L. et al. Brief Review on Bacterial Resistance in K. Pneumoniae. **Open Science Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 11–15, 2019.

MORSE, S. S. et al. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1956–1965, 2012.

NAYAKA, S. Methods and Techniques in Collection, Preservation and Identification of Lichens. **Plant Taxonomy and Biosystematics: Classical and Modern Methods**, n. September, p. 101–128, 2014.

NEKHOROSHEV, S. V. et al. Antimicrobial Activity of Some Lichen Extracts. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 55, n. 11, p. 1190–1195, 2022.

NIEUWLAAT, Robby; MBUAGBAW, Lawrence; MERTZ, Dominik; *et al.* Coronavirus Disease 2019 and Antimicrobial Resistance: Parallel and Interacting Health Emergencies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 9, p. 1657–1659, 2020.

PAOLI, L. et al. Lichens “traveling” in smokers’ cars are suitable biomonitors of indoor air quality. **Ecological Indicators**, v. 103, n. March, p. 576–580, 2019.

PODTEROB, A. P. Chemical composition of lichens and their medical applications. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 10, p. 582–588, 2008.

PRADHAN, Srimay; UPRETI, Dalip Kumar; MEHER, Rajesh Kumar; *et al.* Antimicrobial, anticancer, and antioxidant potential of two dominant macro-lichen *Dirinaria aegialita* and *Parmotrema praesorediosum* collected from Similipal Biosphere Reserve of Odisha, India. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 34–43, 2022.

PRICE, L. B. et al. Colonizing opportunistic pathogens (COPs): The beasts in all of us. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 1–8, 2017.

RANKOVIC, B. **Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015.

RICHARDSON, D. H. S. War in the world of lichens: Parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. **Mycological Research**, v. 103, n. 6, p. 641–650, 1999.

- SAHA, Saparja; PAL, Amrita; PAUL, Santanu. A Review on Pharmacological, Anti-oxidant Activities and Phytochemical Constituents of a Novel Lichen Parmotrema Species. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 11, n. 3, p. 190–203, 2021.
- SANDERS, W. B. Lichens: The interface between mycology and plant morphology. **BioScience**, v. 51, n. 12, p. 1025–1035, 2001.
- SANTOS, Alex Marcelino dos; VITORINO, Luciana Cristina; CRUVINEL, Bárbara Gonçalves; *et al.* Impacts of Cd Pollution on the Vitality, Anatomy and Physiology of Two Morphologically Different Lichen Species of the Genera Parmotrema and Usnea, Evaluated under Experimental Conditions. **Diversity**, v. 14, n. 11, p. 926, 2022.
- SHRESTHA, G. *et al.* In vitro evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 10, p. 1262–1266, 2014.
- SILVA, Hianna A.M.F.; AIRES, André L.; SOARES, Caroline L.R.; *et al.* Schistosomicidal effect of divaricatic acid from Canoparmelia texana (Lichen): In vitro evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of Schistosoma mansoni. **Acta Tropica**, v. 222, p. 106044, 2021.
- SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134–163, 2007.
- TALEBI BEZMIN ABADI, A. *et al.* World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance. **BioNanoScience**, v. 9, n. 4, p. 778–788, 2019.
- TARTOUGA, Maya Abir; ELOUAR, Ibtissem; ZEGHINA, Ibtissem; *et al.* The evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of Parmotrema hypotropa lichen extract. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 0–0, 2022.
- TUAN, Nguyen Trong; DAM, Nguyen Phuc; VAN HIEU, Mai; *et al.* Chemical Constituents of the Lichen Parmotrema Tinctorum and their Antifungal Activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 56, n. 2, p. 315–317, 2020.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic crisis resistance: part 1: causes and threats. **P&T**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.
- VERMA, N.; BEHERA, B. C. Lichen secondary metabolites: Bioactive properties and pharmaceutical potential. In: **Lichen Secondary Metabolites**. [s.l.]: Springer International Publishing, 2015. p. 179–202.
- WANG, W. *et al.* Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.
- WHO ANTIMICROBIAL RESISTANCE DIVISION. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. [s.l.]: World Health Organization, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>>. Acesso em: 3 Jun. 2023.
- WHO, World Health Organization: **Antimicrobial resistance**. World Health Organization: WHO, 17 Nov 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 1 jun 2023.
- WINDELS, E. M. *et al.* Antibiotics: Combatting tolerance to stop resistance. **mBio**, v. 10, n. 5, 2019.
- YADAV, Hitendra; NAYAKA, Sanjeeva; DWIVEDI, Manish. Analytics on Antimicrobial Activity of Lichen

Extract. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 701–708, 2021.