



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Laureana de Vasconcelos Sobral

**FUNGOS ANEMÓFILOS EM AMBIENTES
CLIMATIZADOS: PREVALÊNCIA, PRODUÇÃO DE
ENZIMAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Vitória de Santo Antão

2016

Laureana de Vasconcelos Sobral

**FUNGOS ANEMÓFILOS EM AMBIENTES
CLIMATIZADOS: PREVALÊNCIA, PRODUÇÃO DE
ENZIMAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

- S677f Sobral, Laureana de Vasconcelos.
Fungos anemófilos em ambientes climatizados: prevalência, produção de enzimas e atividade antibacteriana / Laureana de Vasconcelos Sobral. - 2016.
64 folhas: il., tab.
- Orientadora: Idjane Santana de Oliveira
Co-Orientadora: Lidiane Roberta Cruz da Silva
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.
Inclui bibliografia.
1. Qualidade do ar – UFPE. 2. Fungos. 3. Biotecnologia. I. Oliveira, Idjane Santana de (Orientadora). II. Silva, Lidiane Roberta Cruz da (Co-orientadora). III. Título.

613.19 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE- 113/2016



Dissertação de Mestrado apresentada por **Laureana de Vasconcelos Sobral** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**FUNGOS ANEMÓFILOS EM AMBIENTES CLIMATIZADOS: PREVALÊNCIA, PRODUÇÃO DE ENZIMAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**”, orientada pela Prof.^a Dr.^a Idjane Santana de Oliveira e coorientada pela Prof.^a Dr.^a Lidiane Roberta Cruz da Silva, aprovada no dia 12 de julho de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. René Duarte Martins
Núcleo de Saúde Coletiva – CAV/UFPE

Dr. Fábio Marcel da Silva Santos
Núcleo de Enfermagem – CAV/UFPE

Dr.^a Lidiane Roberta Cruz da Silva
Departamento de Micologia - UFPE

Autora:

Laureana de Vasconcelos Sobral

Dedico este trabalho a Deus e a minha família (pais, irmãs e sobrinho).

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade concedida, capacidade confiada e imenso amor.

A minha amada família (José Hélio B. Sobral, Lení V. Sobral, Analaura de V. Sobral, Helení de V. Sobral e Henrique Sobral Vian) pelo apoio e amor incondicional, incentivo constante, por sonhar e acreditar comigo, pela torcida de sempre e por nunca me permitir desistir de sonhos e ideais.

As minhas orientadoras e amigas Dra. Idjane Santana de Oliveira e Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva, presente de Deus na minha vida, pelas orientações, apoio, compreensão nos momentos de estresse e incentivo dispensado.

Ao Professor e amigo Edmário Santos pelas preciosas aulas e pela amizade indispensável.

A amiga Kelly do Nascimento Melo que sempre se fez presente em todas as etapas da pesquisa incentivando e contribuindo para a realização deste trabalho.

A amiga Cleciana Maristela de Souza pelo apoio e contribuição na pesquisa.

Aos meus amigos “Biofilme” do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UFPE/CAV pelo apoio irrestrito e contribuições na pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Vii
LISTA DE TABELAS	Viii
LISTA DE GRÁFICOS	Ix
LISTA DE SÍMBOLOS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	Xi
RESUMO	Xii
ABSTRACT	Xiv
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
CAPÍTULO 2	
Fungos anemófilos em ambientes climatizados: prevalência, produção de enzimas e atividade antibacteriana	13
2.1. Resumo	14
2.2 Abstract	16
2.3 Introdução	18
2.4 Material e Métodos	20
2.5 Resultados e Discussão	24
2.6 Conclusões	36
2.7 Referências Bibliográficas	36
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Colônia de gêneros fúngicos isolados no ar.....	6
Figura 1	Diversidade de colônias de bioaerossóis do ar de diferentes ambientes do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV.....	26
Figura 2	Diversidade de colônias após purificação dos isolados de fungos de diferentes ambientes do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV....	26
Figura 3	Detecção negativa de fungos aflatoxigênicos no ar do CAV em meio AFPA (ausência de cor laranja no reverso das colônias fúngicas).....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Classificação internacional das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB.....	7
Tabela 1	Quantificação de unidades formadoras de colônias fúngicas (UFC) provenientes do ar nos meios de cultura MEA e AFPA e relação ar interno e externo (I/E) dos ambientes do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV.....	25
Tabela 2	Identificação das espécies dos fungos isolados no ar do CAV/UFPE...	32
Tabela 3	Identificação das espécies e produto metabólico de fungos isolados no ar do CAV/UFPE e halo de atividade enzimática (em mm).....	33
Tabela 4	Concentração mínima inibitória da atividade antibacteriana das espécies de fungos isolados no ar do CAV/UFPE.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Frequência dos gêneros fúngicos encontrados no ar dos ambientes analisados do CAV.....	28
-----------	--	----

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
cm ²	Centímetro quadrado
°C	Grau Celsius
H	Horas
±	Mais ou menos
≤	Menor igual
m ³	Metro cúbico
m ²	Metro quadrado
μL	Microlitro
μm	Micrometro
MG	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
-	Negativo
N	Normalidade
%	Porcentagem
+	Positivo
pH	Potencial hidrogênioônico
v/v	Volume/volume

LISTA DE ABREVIATURAS

MEA	Ágar Extrato de Malte
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
AFPA	<i>Aspergillus flavus - parasiticus</i> Ágar
C-C	Carbono-Carbono
C-N	Carbono-Nitrogênio
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
CO	Cobalto
CIPA	Comissão Interna de Prevenção de Acidentes
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
TLC	Cromatografia de Camada Fina
CO ₂	Dióxido de Carbono
US\$	Dólar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HCOH	Formaldeído
I/E	Interno/Externo
MH	Müller-Hinton
Nº	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₃	Ozônio
SAR	Razão entre o número de células na superfície e número de células no ar
ORSA	Resistente à Oxacilina
RE	Resolução
ATP	Trifosfato de Adenosina
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	University Recife Mycologia

RESUMO

Fungos anemófilos são os principais contaminantes no ar de ambientes climatizados podendo promover agravos à saúde. Alguns produzem enzimas de interesse industrial e metabólitos à biotecnologia. O objetivo do trabalho foi avaliar a microbiota fúngica do ar de ambientes climatizados do Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE) e seu potencial biotecnológico para produção enzimática e antimicrobiana. A amostra foi constituída por 82 ambientes climatizados e coletadas da área central dos ambientes através da técnica de sedimentação passiva sobre meios de cultura Ágar Extrato de Malte acrescido de Cloranfenicol e Ágar *Aspergillus Flavus e Parasiticus* para calcular a relação entre o ar interno e externo (I/E), quantificar colônias fúngicas e avaliar presença de cepas aflatoxigênicas confrontamento a legislação vigente da ANVISA. As colônias foram purificadas, identificadas as espécies, preservadas e depositadas no acervo da Coleção de Culturas Micoteca URM da UFPE. Na determinação da atividade enzimática, discos de micélio puros foram repicados para a área central da placa de Petri contendo meios de cultura específicos para as enzimas lipase, amilase e protease e as reações foram constatadas respectivamente pela presença de cristais de sal de cálcio do ácido láurico, utilização de solução de iodo 0,1N e reação química, formando halo translúcido que determinou o potencial enzimático das colônias. Para realizar a atividade antimicrobiana 05 líquidos metabólicos foram testados para determinar as Concentrações Mínimas Inibitórias Bactericidas e Bacteriostáticas, os discos de micélios foram sepados do líquido metabólito para realização dos testes, utilizando cepas de bactérias Gram positivas e negativas, seguindo o método de diluição em caldo da norma técnica da ANVISA M7-A6 e revelados com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. Foi observado crescimento fúngico e diversidade em todos os ambientes, a sala de aula apresentou o menor quantitativo de UFC/m³ (14) enquanto que o espaço farmácia viva, sala da CIPA e o gabinete docente, apresentaram a maior quantidade (290 UFC/m³). A relação I/E dos ambientes atendeu a legislação da ANVISA para qualidade do ar de ambientes climatizados ($\leq 1,5$), variando de 0,1 a 1,5, uma vez que a quantificação do ar externo foi de 188 UFC/m³ e nenhum ambiente apresentou fungos aflatoxigênicos. A frequência dos gêneros fúngicos identificados foram: *Aspergillus* (50%), *Penicillium* (21%), *Talaromyces* (14%), *Curvularia* e *Paecilomyces* (7% cada) e as espécies identificadas foram: *Paecilomyces variotti*, *Penicillium fellutanum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sydowii*, *Talaromyces purpurogenus*, *Aspergillus japonicus*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium chrysogenum* e *Curvularia luneta*.

Dentre as espécies testadas para atividade enzimática, *Aspergillus sydowii* apresentou melhor resultado para produção de amilase (6 mm), lipase (14 mm) e protease (5 mm). Outras duas espécies produziram as três enzimas (*A. parasiticus* e *Penicillium fellutanum*), porém com menor atividade. Apenas três isolados pertencentes a três espécies foram negativos para as 3 enzimas simultaneamente, a saber: *Paecilomyces variotii*, *A. parasiticus lunata* e *Curvularia lunata*. Em relação aos testes de atividade antibacteriana, três líquidos metabólicos apresentaram atividade contra todas as bactérias testadas (*Paecilomyces variotii*, *Talaromyces purpurogenus* e *A. parasiticus*). O líquido metabólico de *Curvularia lunata* não apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias testadas e a espécie *Talaromyces purpurogenus* apresentou melhor atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, chegando à concentração mínima inibitória de 125 µL/mL. Contudo, nenhum líquido metabólico apresentou ação bactericida, apenas bacteriostática. Concluindo que todos os ambientes apresentam biodiversidade de espécies fúngica e não foi encontrado nenhum fungo toxigênico ou patogênico ao homem, atendendo à legislação da ANVISA para ambientes climatizados, o maior potencial enzimático foi a lipolítica alcançada pelas espécies *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus parasiticus* e os líquidos metabólicos das espécies *Paecilomyces variotii*, *Talaromyces purpurogenus* e *Aspergillus parasiticus* apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias desafiadas, sendo a espécie *Talaromyces purpurogenus* a que obteve melhor resultado. Os fungos filamentosos do ar apresentam potencial para atividade enzimática e antimicrobiana.

Palavras-Chave: Bioaerossóis, qualidade do ar, fungos filamentosos, biotecnologia.

ABSTRACT

Airborne fungi are the main contaminants in the air-conditioned environments can promote health problems. Some produce enzymes of industrial interest and metabolites biotechnology. The objective was to evaluate the fungal microbiota of the air-conditioned rooms of the Academic Center of Vitória/Federal University of Pernambuco (CAV/UFPE) and its biotechnological potential for enzyme and antimicrobial production. The sample consisted of 82 air-conditioned rooms and collected the central area of the environment through passive sedimentation technique on culture media Agar Malt Extract plus chloramphenicol and agar *Aspergillus Flavus* and *parasiticus* to calculate the relationship between indoor air and outdoor (I/E), quantify fungal colonies and evaluate the presence of aflatoxigênicas confrontation strains current legislation ANVISA. The colonies were purified, identified the species, preserved and deposited in the collection of the Culture Collection URM Culture Collection of the UFPE. In the determination of enzymatic activity, pure mycelial discs were transferred to the central area of the Petri plate containing specific culture media for lipase, amylase and protease and the reactions were detected respectively by the presence of calcium salt crystals of lauric acid, iodine solution using 0.1N and chemical reaction, forming translucent halo that determined the enzyme potential of the colonies. To achieve the antimicrobial activity 05 metabolic liquids were tested for minimal inhibitory concentrations bactericides and bacteriostatic the mycelial discs were sepados liquid metabolite for carrying out the tests, utilizanddo strains of positive and Gram negative bacteria, following the dilution method in bouillon the technical standard of ANVISA M7-A6 and stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium. Growth was observed fungal and diversity in all environments, the classroom had the lowest quantity of UFC/m³ (14) while the space living pharmacy, CIPA room and the teacher's office, had the highest number (290 UFC/m³). The I/E ratio of environments picked ANVISA legislation for air quality in conditioned environment (≤ 1.5), ranging from 0.1 to 1.5, since the quantification of outdoor air was 188 UFC/m³ and no environment presented aflatoxigenic fungi. The frequency of the identified fungal genera are *Aspergillus* (50%), *Penicillium* (21%), *Talaromyces* (14%), *Curvularia* and *Paecilomyces* (7% each) and the identified species were *Paecilomyces variotti*, *Penicillium fellutanum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sydowii*, *Talaromyces purpurogenus*, *Aspergillus japonicus*, *Penicillium oxalicum*, *Penicullium chrysogenum* and *Curvularia spyglass*. Among the species tested for enzymatic activity, *Aspergillus sydowii* showed better results for amylase production (6 mm), lipase (14 mm) and protease (5 mm). Two other

species produced the three enzymes (*A. parasiticus* and *Penicillium fellutanum*), but with less activity. Only three isolates belonging to three species were negative for the 3 enzymes simultaneously, namely *Paecilomyces variotii*, *A. parasiticus lunata* and *Curvularia lunata*. Regarding the antibacterial activity tests three metabolic liquid showed activity against all tested bacteria (*Paecilomyces variotii*, *Talaromyces purpurogenus* and *A. parasiticus*). Metabolic liquid *Curvularia lunata* showed no antibacterial activity against bacteria tested and *Talaromyces purpurogenus* species showed better antibacterial activity against all bacteria tested, reaching the minimum inhibitory concentration of 125 µL/mL. However, no metabolic liquid showed bactericidal action, only bacteriostatic. Concluding that all environments present biodiversity of fungal species and not found any toxigenic or pathogenic fungus to man, given the ANVISA legislation for climate-controlled environments, the highest enzyme potential was lipolytic achieved by the species *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus parasiticus* and metabolic liquids species *Paecilomyces variotti*, *Talaromyces purpurogenus* and *Aspergillus parasiticus* presented antimicrobial activity against all challenged bacteria, *Talaromyces purpurogenus* species being that obtained better results. Filamentous fungi air show potential for enzyme and antimicrobial activity.

Keywords: Bioaerosols, air quality, filamentous fungi, biotechnology.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Fungos possuem grande aptidão para sintetizar e produzir inúmeras moléculas orgânicas com baixo peso molecular e com ação biologicamente interessante (DAMIANO *et. al*, 2015). A diversidade de metabólitos secundários é obtida para estudar atividades biológicas provenientes do solo, água, plantas e mais recentemente ambientes marinhos, explorando o metabolismo secundário com finalidade de realizar testes utilizando líquidos e extratos metabólicos ou metabólitos isolados por cromatografia. Metabólitos secundários são compostos extracelulares de interesse industrial obtidos em geral durante a fase estacionária de vários micro-organismos (SPECIANA *et. al*, 2014).

Fungos filamentosos despertam maior interesse por biosintetizar um excelente quantitativo de metabólitos, atingindo 73% de produção em comparação a outros micro-organismos nessa mesma fase (SPECIANA *et. al*, 2014) e atuam como fonte de produção de enzimas extracelulares. As enzimas microbianas produzidas especialmente por fungos e bactérias representam a maior classe enzimática utilizada pela biotecnologia e química orgânica (MORENO *et. al*, 2013). Dos grupos de enzimas com interesse industrial, as proteases, lipases e amilases são as mais comumente usadas.

Além de enzimas, os fungos são potenciais fontes de agentes antimicrobianos, sendo o gênero *Penicillium* o primeiro a ser descrito na literatura como produtor do antibiótico, penicilina (RAVAT *et. al*, 2011). A dispersão e aparecimento de micróbios resistentes a antimicrobianos disponíveis no comércio são descritos na literatura há anos, impulsionando assim a procura por fontes de substâncias com ação antimicrobianas eficazes (SANTOS *et. al*, 2014) e neste sentido, diversas pesquisas tem sido desenvolvidas com a finalidade de intervir, impedir ou intensificar a ação de drogas terapêuticas convencionais à resistência bacteriana (BASTOS *et. al*, 2011; CATÃO *et. al*, 2014).

Os fungos designados anemófilos constituem os principais contaminantes no ar de ambientes climatizados artificialmente, sendo o quantitativo de fungos no ambiente interior

reflexo da amplificação dos poluentes do ambiente externo que originam fontes poluidoras internas. Nestes ambientes a ANVISA considera inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxigênicos (BRASIL, 2003).

O monitoramento para identificar os níveis de qualidade do ar em ambientes climatizados artificialmente, está determinado de acordo com a Resolução RE Nº 9, de 16 de janeiro de 2003, da ANVISA que definem padrões referenciais técnicos de limpeza e manutenção de sistemas de ar condicionado, qualidade e monitoramento do ar interno. O objetivo é garantir a saúde e segurança de indivíduos que frequentam locais públicos e coletivos com ambientes climatizados, expressando como valor máximo recomendável de contaminação microbiológica aceitável $\leq 750 \text{ UFC/m}^3$ e de $\leq 1,5$ para relação entre o ar interno e externo (BRASIL, 2003).

A qualidade dos ambientes internos é uma preocupação relevante de saúde pública. A crescente preocupação se dá pelo estilo de vida populacional onde indivíduos permanecem cerca de 70 a 90% do dia em ambientes fechados, bem como devido à poluição atmosférica, variedade de substâncias químicas e agentes biológicos dispostos nestes ambientes (ZIEHE *et. al*, 2014). A OMS estima que cerca de metade da população mundial sofra com a má qualidade do ar interior, com comprometimento do sistema respiratório e cardiovascular, sendo esse tema fator importante na saúde e bem estar da população (NUNES, 2013).

Os fungos possibilitam minimizar poluentes e resíduos do ambiente, visto que desempenham ação relevante no processo biológico de conservação e renovação de compostos químicos, além de produzir produtos de interesse industrial como alimentícios, farmacológicos, médicos, têxtil, de detergentes, fermentação, papel bebidas, tratamento de couro e químico-analítica (SOARES *et. al*, 2010).

A microbiota fúngica existente no ar atmosférico ainda são inexplorados para isolamento de fungos que possam conter alguma atividade biológica. Desta forma o presente trabalho visa estudar a qualidade microbiológica do ar do Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco e analisar o potencial biotecnológico dos fungos isolados para produção de enzimas e atividade antimicrobiana.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica do ar do Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco e analisar o potencial biotecnológico dos fungos isolados para produção de enzimas e atividade antimicrobiana.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Isolar e identificar os fungos filamentosos do ar do Centro Acadêmico de Vitória;
- ✓ Preservar os fungos isolados e depositar cada espécie no acervo da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco;
- ✓ Avaliar a produção de enzimas proteases, lipases e amilases pelos fungos isolados do ar;
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana dos líquidos metabólitos fúngicos.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Fungos filamentosos anemófilos

Fungos são eucariotos amplamente distribuídos na natureza, considerados cosmopolitas por estarem presentes em vários habitats tais como ar, água, terra, animais e alimentos. Os fungos anemófilos apresentam dispersão aérea sob a forma de aerossóis e pertencem a distintos gêneros e espécies (FLORES; ONOFRE, 2010).

Os fungos designados anemófilos constituem os principais contaminantes no ar de ambientes fechados e climatizados artificialmente, sendo o quantitativo de fungos no ambiente interior reflexo da amplificação dos poluentes do ambiente externo que originam fontes poluidoras internas. Nestes ambientes a ANVISA considera inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxigênicos (BRASIL, 2003).

O monitoramento para identificar os níveis de qualidade do ar em ambientes climatizados artificialmente, está determinado de acordo com a Resolução RE Nº 9, de 16 de janeiro de 2003, da ANVISA que definem padrões referenciais técnicos de limpeza e manutenção de sistemas de ar condicionado, qualidade e monitoramento do ar interno. O objetivo é garantir a saúde e segurança de indivíduos que frequentam locais públicos e coletivos com ambientes climatizados, expressando como valor máximo recomendável de contaminação microbiológica aceitável $\leq 750 \text{ UFC/m}^3$ e de $\leq 1,5$ para relação entre o ar interno e externo (BRASIL, 2003).

A qualidade dos ambientes internos é uma preocupação relevante de saúde pública. A crescente preocupação se dá pelo estilo de vida populacional onde indivíduos permanecem cerca de 70 a 90% do dia em ambientes fechados, bem como devido à poluição atmosférica, variedade de substâncias químicas e agentes biológicos dispostos nestes ambientes (ZIEHE *et. al*, 2014). A OMS estima que cerca de metade da população mundial sofra com a má qualidade do ar interior, com comprometimento do sistema respiratório e cardiovascular, sendo esse tema fator importante na saúde e bem estar da população (NUNES, 2013).

Ao avaliar a qualidade do ar de ambientes internos, existem vários parâmetros a serem considerados, além do biológico, tais como: partículas dispersas no ar, taxa de CO_2 , CO, HCOH, O_3 , umidade relativa e temperatura (BRASIL, 2003).

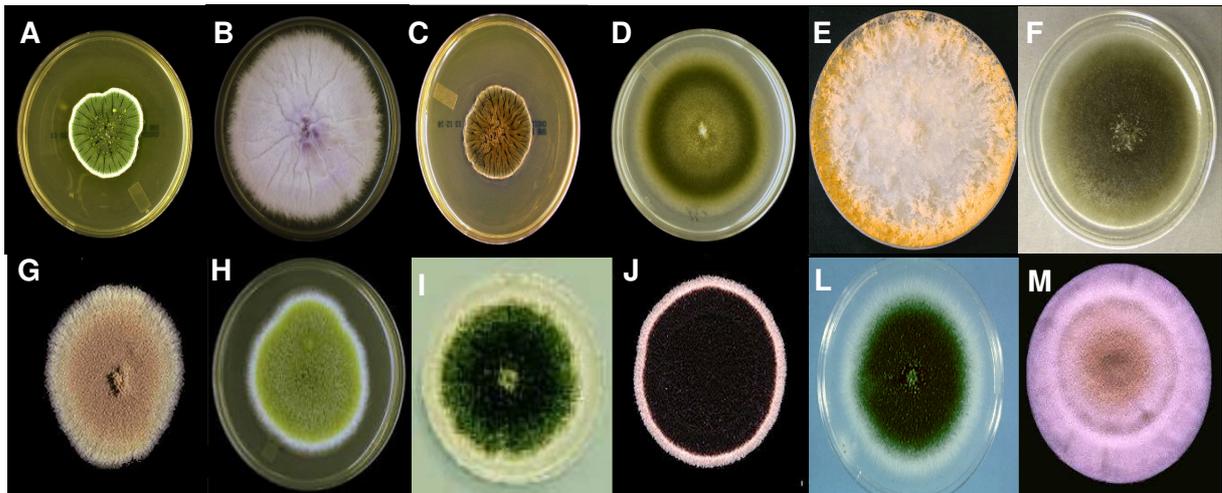
No ambiente, os aglomerados fúngicos são influenciados por fatores ambientais como variáveis de temperatura, umidade, corrente de ar, substratos orgânicos disponíveis, condições climáticas e variação sazonal, e por fatores físicos compreendidos pela forma, tamanho e densidade das partículas, entre outras situações que corroboram para o aumento dos conídios no ambiente (BOFF, 2011).

Diversas espécies de microrganismos dispersam bioaerossóis no ar dos ambientes internos e externos variando de 0,3 a 100 μm de composição diversificada envolvendo fragmentos celulares, subprodutos do metabolismo microbiano e microrganismos, sendo os conídios fúngicos a maior parcela dos constituintes biológicos suspensos no ar atmosférico (CABRAL, 2010).

A dimensão dos conídios inalados tem relação intrínseca com a deposição no trato respiratório e conseqüentemente com a agressividade, uma vez que as partículas maiores que 10 μm de diâmetro se depositam na superfície e ficam retidas no trato respiratório superior, atingem a nasofaringe e estão ligadas a sintomatologias nasais e oculares. Enquanto as partículas inferiores a 10 μm alcançam o trato respiratório inferior, sobretudo partículas menores que 6 μm tendem a permanecer no ar e podem atingir os brônquios e os alvéolos pulmonares, como os conídios de *Aspergillus* spp que apresentam diâmetro de 2 a 3 μm (BOFF, 2011).

Os gêneros fúngicos comumente isolados no ar são *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Neurospora* sp. e *Alternaria* sp. (CABRAL, 2010), sendo *Aspergillus* e *Penicillium* os primeiros colonizadores de superfícies e interiores (AGARWAL; CHAKRABARTI, 2010) e *Alternaria* sp. mais comum no ar externo. O gênero *Aspergillus* comum em ambientes internos e externos é conhecido por causar processos alérgicos e as espécies mais importantes clinicamente são *A.fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. oryzae* (HAWKSWORTH, 2011). A figura 1 mostra a colônia dos gêneros supracitados.

Figura 1.1 Colônia de gêneros fúngicos isolados no ar



Fonte: www.google.com

Legenda: *Penicillium* (A), *Fusarium* (B), *Cladosporium* (C), *Curvularia* (D), *Neurospora crassa* (E), *Alternaria* (F), *Aspergillus terreus* (G), *Aspergillus flavus* (H), *Aspergillus parasiticus* (I), *Aspergillus niger* (J), *Aspergillus fumigatus* (L), *Aspergillus oryzae* (M).

A contaminação fúngica é considerada importante devido à produção de micotoxinas. Parte dos fungos filamentosos em condições adequadas de oxigênio, temperatura e umidade, se desenvolvem produzindo metabólitos secundários capazes de originar uma vasta variedade de efeitos tóxicos (micotoxinas) tanto para homens quanto para animais, como é o caso dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O gênero *Aspergillus* é composto por algumas espécies toxigênicas, dentre elas *A. flavus* e *A. parasiticus*, as mais importantes do gênero por produzir aflatoxinas (PELUQUE, 2014).

As aflatoxinas são classes de micotoxinas (moléculas baixo peso molecular produzida no metabolismo secundário) produzidas por cepas de fungos do gênero *Aspergillus* e classificadas segundo o IARC (International Agency for Research on Cancer) como pertencentes ao grupo 1 de substâncias cancerígenas ao homem (IARC, 2002). Existem duas principais espécies do gênero *Aspergillus* que são produtoras de aflatoxinas que são *A. flavus* que produz exclusivamente a aflatoxina B e *Aspergillus parasiticus* responsável pela produção de aflatoxinas B e G. As aflatoxinas M1 e M2 são metabólitos hidroxilados dos tipos B1 e B2, respectivamente (CARÃO *et. al*, 2014). Dentre as micotoxinas de maior importância para a saúde pública as aflatoxinas se destacam (EMBRAPA, 2013).

O gênero *Penicillium* é produtor de diversas micotoxinas, e algumas espécies têm impacto econômico, pois são exploradas por indústrias, principalmente para produção de

enzimas, embora esse gênero apresente muitas aplicações (VISAGIE *et. al*, 2014). A exposição dos indivíduos a micotoxinas pode provocar reações que incluem hemorragias e necroses, e em abundância essas toxinas têm afinidade por alguns órgãos ou tecidos específicos como fígado, rins e sistema nervoso, sendo esses os mais comprometidos (IARC, 2002). Além disso, muitas espécies de fungos, incluindo as que estão presentes no ar podem ser responsáveis pela produção de vários metabólitos com as mais variadas aplicações industriais e biológicas, dentre elas atividade enzimática (VIRIATO, 2014).

1.3.2 Enzimas Fúngicas

As enzimas são proteínas essenciais que fazem a catalização das reações químicas no sistema metabólico biológico de organismos vivos e desempenha um papel essencial na degradação orgânica, na infecção e na deterioração de alimentos, versa sobre as enzimas a responsabilidade de intensificar a atividade das reações, mas essa velocidade está ligada a fatores como temperatura, pH e concentração enzimática (LEHNINGER *et. al*, 2006).

A classificação das enzimas é determinada pela reação que cada enzima cataliza, mas devido à imprecisão na nomenclatura e a crescente descoberta de novas enzimas, foi firmado um acordo internacional para um novo sistema de nomeação e classificação (LEHNINGER *et. al*, 2006) que segue abaixo.

Tabela 1.1 Classificação internacional das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB.

Número	Classe	Tipo de reação catalizada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íon hidreto ou átomo H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (reações de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Adição de grupos em ligações duplas ou formações de ligações duplas pela remoção de grupos
5	Isomerase	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligasas	Formação de ligações C-C e C-N pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação

Fonte: Lehninger *et. al*, (2006).

As enzimas que são naturalmente catalizadoras biológicas são aproveitadas em diversas reações e por isso de interesse industrial (ORLANDELLI *et. al*, 2012). As enzimas microbianas produzidas especialmente por fungos e bactérias representam a maior classe enzimática utilizada pela biotecnologia e química orgânica (MORENO *et. al*, 2013). Dos grupos de enzimas com interesse industrial, as proteases, lipases e amilases são as mais comumente usadas.

Biologicamente, as enzimas microbianas são eleitas pelas indústrias por apresentarem tempo de produção reduzido, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilização, bem como fácil manipulação genética (NAGARAJAN, 2012) e elevada diversidade bioquímica (SILVA *et. al*, 2015). Entretanto, a utilização da enzima por parte das indústrias está relacionada especialmente à minimização de custos com produção (REINEHRA *et. al*, 2014) e com o resíduo e consumo elétrico, embora atualmente o comércio de enzimas tenha potencial para rentabilidade devido a busca por produtos de alta qualidade (SILVA *et. al*, 2015). As enzimas microbianas são relevantes no crescimento de bioprocessos industriais. Tornou-se imprescindível atualmente a busca por enzimas originais, aprimoradas e mais versáteis com o intuito de desenvolver sustentabilidade e processos de fabricação econômica e competitiva (ADRIO; DEMAINE, 2014).

As enzimas produzidas por micróbios são primordiais para área industrial, farmacêutica e biotecnológica (SANCHEZ; DEMAINE, 2011), uma vez que a totalidade do comércio industrial de enzimas alcançou em 2010 o equivalente a US\$ 3,3 bilhões e estimava-se para 2015 cerca de US\$ 4,4 bilhões, sendo o couro e o bioetanol o motivador da elevação das vendas. A tecnologia enzimática faturou aproximadamente US\$ 1,2 bilhão em 2011, para 2015 esperava-se faturar US\$ 1,5 bilhão e as expectativas para 2016 são de US\$ 1,7 bilhão, já para a indústria de alimentos e bebidas almejava-se atingir US\$ 1,3 bilhão em 2015 e para 2016 US\$ 1,8 bilhões (ADRIO; DEMAINE, 2014).

Dentre os micro-organismos não patogênicos com competência para produção de enzimas úteis, os fungos filamentosos sobressaem-se em função da facilidade de cultivo, pois secretam as próprias enzimas no meio em que estiver assim não há a necessidade de liberação por rompimento celular. Os fungos filamentosos também dispõem de condições elevadas de produção enzimática com potencial para diversidades de aproveitamento industrial. Além do mais, são susceptíveis a permanecer com fonte primordial de novas biomoléculas comerciais (SILVA *et. al*, 2015).

Dentre as enzimas, a protease conhecida também por enzima proteolítica ou peptidase, catalisa a hidrólise de proteínas em fragmentos menores de protease e aminoácido para absorção celular, sendo essencial para o metabolismo do nitrogênio

(SABOTIC; KOS, 2012) e estão presentes na síntese e degradação de proteínas, conidiogênese e descarga conidial, germinação, modificação enzimática, nutrição e regulação da expressão gênica (NAKAMURA; IKETANI; SHIOI, 2011; ZHENG; WANG; ZHANG, 2011).

A protease participa de forma decisiva em processos fisiológicos e patológicos como catabolismo proteico, coagulação sanguínea, organização tecidual, crescimento tumoral e metástase, liberação hormonal, inflamação, crescimento e migração celular e transporte de proteínas secretoras através de membranas (SOUZA *et. al*, 2015).

Este grupo de enzima compõe um dos mais extensos para interesse industrial e concebe aproximadamente 60% da totalidade de enzimas comercializadas mundialmente (ZAMBARE; NILEGAONKAR; KANEKAR, 2011). Industrialmente são utilizadas em alimentos, conservantes, processamento de carnes, detergentes e no tratamento de couro (KUDRYAVTSEVA *et. al*, 2010), cerveja e indústrias farmacêuticas (DABOOR *et. al*, 2010; HSIAO, 2014).

As lipases são empregadas como biocatalisadores solúveis em química orgânica contemporânea, sobretudo, pela capacidade de transformação de gorduras e outros lipídeos através da hidrólise, esterificação e interesterificação (TREICHEL *et. al*, 2010; AARTHY *et. al*, 2014). Métodos químicos convencionais apresentam um custo energético mais elevado quando confrontado com as biotransformações catalisadas pela enzima lipase que pode ser gerida com pressão normal e temperatura ambiente (QUEIROZ *et. al*, 2014). Entretanto, o uso livre torna-se restrito mediante custo, impossibilidade de reutilizar e estabilidade química e térmica (FICANHA *et. al*, 2015). Biotecnologicamente a lipase é utilizada na composição de detergentes e indústria de couro (GRIEBELER *et. al*, 2015).

Outro grupo de enzimas importantes é o das amilases. As amilases hidrolisam o amido e sua classificação dependerá de como age a enzima sobre estas moléculas (PATHAK; NARULA, 2013). O grupo das endoamilases catalisa aleatoriamente a hidrólise da molécula do amido, provocando o desenvolvimento de oligossacarídeos ramificados e lineares de diversa extensão de cadeia. As exoamilases hidrolisam a partir do extremo não redutor derivando em produtos curtos. Para hidrólise completa do amido é imprescindível a ação conjugada de distintas enzimas (GUPTA *et. al*, 2003). A amilase forma o essencial grupo de enzima utilizada na indústria alimentícia (DEB *et. al*, 2013), médica e farmacêutica, têxtil, de detergentes, fermentação, papel e químico-analítica (SOARES *et. al*, 2010).

Dentre as atividades biológicas mais estudadas e mais facilmente acessadas, a produção de enzimas por fungos isolados dos mais variados ambientes é rotina no

laboratório de micologia. Entretanto, os fungos endofíticos são os mais estudados. E praticamente não se conhece sobre o potencial enzimático dos fungos do ar.

Aboul-Nasr *et. al.*, (2003) estudaram a produção de enzimas por 110 isolados fúngicos encontrados no ar de unidade de terapia intensiva e sala de cirurgia em hospital da Índia. Dentre os 110 fungos isolados 73 (66,%) produziram protease, 92 (83,6%) lipase e 78 (70,9%) produziram urease, indicando potencial industrial para esses fungos. E 24 (22%) isolados produziu as 3 enzimas simultaneamente.

Acremonium, *Alternaria*, *Alternaria chlamydosporus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, são exemplos de fungos endofíticos que foram encontrados produzindo as enzimas extracelulares amilase, celulase, lipase e protease (MARIA; SRIDHAR; RAVIRAJA, 2005). Além de enzimas, os fungos filamentosos são potenciais fontes de agentes antimicrobianos, sendo o gênero *Penicillium* o primeiro a ser descrito na literatura como produtor do antibiótico, penicilina (RAVAT *et. al.*, 2011).

1.3.3 Atividade antimicrobiana de fungos filamentosos

A busca da humanidade pela cura de enfermidades acontece desde a antiguidade e está intrinsicamente pautada no etnoconhecimento de produtos naturais (CLEMENTINO *et. al.*, 2015). A dispersão e aparecimento de micróbios resistentes a antimicrobianos disponíveis no comércio são descritos na literatura há anos, impulsionando assim a procura por fontes de substâncias com ação antimicrobianas eficazes (SANTOS *et. al.*, 2014) e neste sentido, diversas pesquisas tem sido desenvolvidas com a finalidade de intervir, impedir ou intensificar a ação de drogas terapêuticas convencionais à resistência bacteriana (BASTOS *et. al.*, 2011; CATÃO *et. al.*, 2014).

As pesquisas relacionadas a novas gerações de antimicrobianos se fundamentam não apenas pela seleção de micróbios resistentes, mas também pelo surgimento de novos patógenos, diversos antibióticos com implicações colaterais, necessidade de antimicrobianos que substituem agrotóxicos e por fim, a resistência de patógenos a antibióticos comercializados (CLEMENTINO *et. al.*, 2015).

O uso indiscriminado de medicação com ação antibacteriana é narrado como os responsáveis basais pela seleção de microrganismos resistentes a drogas como germicidas, antibióticos e desinfetantes. E esta questão está relacionada ao fato das bactérias possuírem competência genética de obter e transferir resistência contra propriedades antibacterianas acessíveis no presente, igualmente como os fungos que dispõem de mutações intrínsecas que favorece o aparecimento de cepas resistentes (TINTINO *et. al.*,

2015). Fungos já foram biotecnologicamente pesquisados e manipulados para produção de compostos com ação antiparasitária, antifúngica, antibiótica e antineoplásica (CAMPOS, 2009; CLEMENTINO *et. al*, 2015).

A biotecnologia utiliza os fungos como uma perspectiva de aplicação biológica para o surgimento de uma nova geração de antibióticos empregado como fonte natural renovável (CLEMENTINO *et. al*, 2015). Da mesma forma ocorre com os agentes antifúngicos no qual o desafio é encontrar novos agentes com amplo espectro que sejam seguros e, sobretudo eficientes (FERREIRA *et. al*, 2013).

A biodiversidade de microbiota fúngica é conhecida por seu desempenho ambiental, versatilidade de metabólitos secundários e pela ágil reprodução de resultados (SANTOS, 2012). Diante disso, diversos fármacos foram e são criados por substâncias naturais encontradas na diversidade ambiental (JANG *et. al*, 2013). Aliada a indústria farmacêutica, a biotecnologia visa estimular e otimizar o descobrimento e refinamento de novas drogas (CLEMENTINO *et. al*, 2015).

Os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* possuem uma produção estimada de 1000 tipos de antibióticos, tornando-os de fundamental importância para pesquisa de novos metabólitos potencialmente ativos (BÉRDY, 2005). O gênero *Fusarium* também tem a sua importância sendo considerado como uma fonte rica de compostos, com interesse biotecnológico pela produção de novos metabólitos secundários com atividades biológicas diversas (SCHULZ *et. al*, 2002). Os fungos mais comumente estudados para fins de atividade antimicrobiana são os endofíticos e fungos de solo.

CAPÍTULO 2

Análise fungos anemófilos em ambientes climatizados: prevalência, produção de enzimas e atividade antibacteriana.

Artigo a ser submetido a:

Brazilian Journal of Biosciences

ISSN: 1980-4849 (on-line) / 1679-2343 (print)

Qualis Capes: B2

**Análise fungos anemófilos em ambientes climatizados: prevalência,
produção de enzimas e atividade antibacteriana**

**Fungi analysis airborne in air-conditioned environments: prevalence,
production of enzymes and antibacterial activity**

Laureana de Vasconcelos Sobral¹; Kelly do Nascimento Melo²; Cleciana Maristela de Souza³; Idjane Santana de Oliveira⁴; Lidiane Roberta Cruz da Silva⁵.

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória, PE, Brasil.

²Acadêmico do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória, PE, Brasil.

³Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória, PE, Brasil.

⁴Docente da Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória, PE, Brasil.

⁵Bióloga e Doutora em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

Autor para contato: Laureana de Vasconcelos Sobral (laurenavsobral@gmail.com)

Endereço: Avenida Vera Cruz, 558, São Francisco, CEP: 55.008.000, Caruaru/PE, Brasil.

Telefone: (81) 9.9995.5396

Resumo

Fungos anemófilos são os principais contaminantes no ar de ambientes climatizados podendo promover agravos à saúde. Alguns produzem enzimas de interesse industrial e metabólitos à biotecnologia. O objetivo do trabalho foi avaliar a microbiota fúngica do ar do Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE) e avaliar seu potencial biotecnológico para produção enzimática e antimicrobiana. A amostra foi constituída por 82 ambientes climatizados e coletadas através da técnica de sedimentação passiva. Foi realizada a relação entre o ar interno e externo (I/E) e avaliada a possibilidade de presença de cepas aflatoxigênicas para confronto com a legislação da ANVISA. Discos de micélios foram repicados para meios específicos de lipase, amilase e protease para determinar a atividade enzimática, a leitura foi realizada pela visualização de cristais de sal de cálcio do ácido láurico e halos translúcidos. Para determinação da atividade antimicrobiana, foram testados 05 líquidos metabólicos das espécies identificadas para determinar a concentração mínima inibitória bactericida e bacteriostática desafiando 8 cepas bacterianas através do método de diluição da ANVISA M7-A6 e revelados pela solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2% v/v). Foi observada diversidade em todos os ambientes do CAV, a sala de aula apresentou o menor quantitativo de UFC/m³ (14) enquanto que o espaço farmácia viva, sala da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes e o gabinete docente, apresentaram o maior quantitativo (290 UFC/m³). A relação I/E dos ambientes atendeu a legislação vigente da ANVISA para qualidade do ar de ambientes climatizados ($\leq 1,5$), variando essa relação 0,1 a 1,5, o mínimo e máximo, respectivamente, uma vez que a quantificação do ar externo foi de 188 UFC/m³ e nenhum ambiente apresentou fungos aflatoxigênicos. A frequência dos gêneros fúngicos cujas amostras foram possíveis identificar foram: *Aspergillus* (50%), *Penicillium* (21%), *Talaromyces* (14%), *Curvularia* e *Paecilomyces* (7% cada) e as espécies identificadas foram: *Paecilomyces variotti*, *Penicillium fellutanum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sydowii*, *Talaromyces purpurogenus*, *Aspergillus japonicus*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium chrysogenum* e *Curvularia luneta*. Dentre as espécies testadas para atividade enzimática, *Aspergillus sydowii* apresentou melhor resultado para produção de amilase (6 mm), lipase (14 mm) e protease (5 mm). Outras duas espécies produziram as três enzimas (*A. parasiticus* e *Penicillium fellutanum*), porém com menor atividade. Em relação aos testes de atividade antibacteriana, três líquidos metabólicos apresentaram atividade contra todas as bactérias testadas, o líquido metabólico da espécie *Talaromyces purpurogenus* foi o que apresentou melhor atividade antibacteriana

contra todas as bactérias testadas, chegando à concentração mínima inibitória de 125µL/mL. Contudo, nenhum líquido metabólico apresentou ação bactericida, apenas bacteriostática. Concluindo que todos os ambientes apresentam biodiversidade de espécies fúngica, não foi encontrado nenhum fungo toxigênico ou patogênico, atendendo à legislação da ANVISA para ambientes climatizados, o maior potencial enzimático foi a lipolítica alcançada pelas espécies *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus parasiticus* e os líquidos metabólicos das espécies *Paecilomyces variotti*, *Talaromyces purpurogenus* e *Aspergillus parasiticus* apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias desafiadas, sendo a espécie *Talaromyces purpurogenus* a que obteve melhor resultado. Os fungos filamentosos do ar apresentam potencial para atividade enzimática e antimicrobiana

Palavras-chave: Qualidade do ar, fungos filamentosos, ambientes refrigerados, bactérias, enzimas.

Abstract

Airborne fungi are the main contaminants in the air-conditioned environments can promote health problems. Some produce enzymes of interest enzymes of industrial interest and metabolites biotechnology. The objective was to evaluate the fungal microbiota of the air of the Academic Center of Vitória / Federal University of Pernambuco (CAV/UFPE) and evaluate its potential for biotechnological and antimicrobial enzyme production. The sample consisted of 82 air-conditioned environments and collected by passive sedimentation technique. the relationship between internal and external air (I/E) and assessed the possibility of the presence of strains aflatoxigênicas for confrontation with the ANVISA legislation was carried out. mycelial discs were transferred to media-specific lipase, amylase and protease to determine the enzyme activity, the reading was performed by the visualization of calcium salt crystals of lauric acid and translucent halos. To determine the antimicrobial activity, 05 metabolic net of identified species were tested to determine the minimum inhibitory concentration bactericidal and bacteriostatic challenging 8 bacterial strains through dilution method ANVISA M7-A6 and disclosed by the 2,3,5-chloride solution triphenyltetrazolium chloride (2% v/v). diversity was observed in all CAV environments, the classroom had the lowest quantity of UFC/m³ (14) while the space living pharmacy, Internal Commission room for Accident Prevention and the teacher's office, showed the highest quantity (290 UFC/m³). The I/E ratio of environments attended ANVISA legislation for air quality air-conditioned environments (≤ 1.5), varying the ratio 0.1 to 1.5, the minimum and maximum, respectively, since the quantification the outside air was 188 UFC/m³ and no environment presented aflatoxigenic fungi. The frequency of fungal genera which samples were possible to identify were: *Aspergillus* (50%), *Penicillium* (21%), *Talaromyces* (14%), *Curvularia* and *Paecilomyces* (7% each) and the identified species were *Paecilomyces variotti*, *Penicillium fellutanum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sydowii*, *Talaromyces purpurogenus*, *Aspergillus japonicus*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium chrysogenum* and *Curvularia spyglass*. Among the species tested for enzymatic activity, *Aspergillus sydowii* showed better results for amylase production (6 mm), lipase (14 mm) and protease (5 mm). Two other species produced the three enzymes (*A. parasiticus* and *Penicillium fellutanum*), but with less activity. Regarding the antibacterial activity tests three metabolic liquid showed activity against all bacteria tested, the metabolic liquid *Talaromyces purpurogenus* species showed the best antibacterial activity against all bacteria tested, reaching the minimum inhibitory concentration of 125 μ L/mL. However, no metabolic liquid showed bactericidal action, only bacteriostatic. Concluding that all environments present

biodiversity of fungal species, no toxigenic or pathogenic fungus was not found, given the ANVISA legislation for climate-controlled environments, the highest enzyme potential was lipolytic achieved by the species *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus parasiticus* and metabolic net of species *Paecilomyces variotti*, *purpurogenus Talaromyces* and *Aspergillus parasiticus* presented antimicrobial activity against all challenged bacteria, *Talaromyces purpurogenus* species being that obtained better results. The filamentous fungi of the air have potential for enzyme activity and antimicrobial

Keywords: Air quality, filamentous fungi, chilled environments, bacteria, enzymes.

Introdução

Fungos possuem vasta distribuição na natureza e são encontrados em vários habitats como o ar, água, solo, animais e alimentos, geralmente não patogênicos, podem agir como patógenos oportunistas. Possuem aptidão para colonizar diferentes substratos, têm extensa distribuição geográfica e capazes de crescer em condições ambientais diversas (OLIVEIRA; BORGES-PALUCH, 2015).

Os bioaerossóis são compostos de células bacterianas, fungos, fragmentos celulares e produtos do metabolismo microbiano, são caracterizados como os principais contaminantes do ar (YASSIN; ALMOUQATEA, 2010) tornando os ambientes interiores como fonte de exposição e podem atuar como indicador microbiológico do nível de contaminantes ambientais (RÊGO; SANTOS, 2015). Há associação apontando riscos elevados à saúde humana devido a presença de fungos no ar, umidade e diversidade de substâncias químicas e fragmentos biológicos em ambientes fechados. Além disso, o estilo de vida populacional contribui devido à longa permanência nestes locais (ZIEHE *et. al*, 2014).

A exposição à bioaerossóis pode implicar em reações tóxicas, doenças respiratórias e alérgicas, mundialmente, cerca de 10% dos indivíduos apresentam alergia a fungos (YASSIN; ALMOUQATEA 2010). É possível encontrar no ar diversos alérgenos e agentes patogênicos em fragmentos grossos que precipitam rapidamente e alcançam o trato respiratório superior e finos que persistem na atmosfera por semanas e alcançam o trato respiratório inferior (FRÖHLICH-NOWOISKY *et. al*, 2009).

A contaminação fúngica é considerada importante devido à produção de micotoxinas. Parte dos fungos filamentosos em condições adequadas de oxigênio, temperatura e umidade, se desenvolvem produzindo metabólitos secundários capazes de originar uma vasta variedade de efeitos tóxicos (micotoxinas) tanto para homens quanto para animais, como é o caso dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O gênero *Aspergillus* é composto por algumas espécies toxigênicas, dentre elas *A. flavus* e *A. parasiticus*, as mais importantes do gênero por produzir aflatoxinas (PELUQUE, 2014).

As aflatoxinas são classes de micotoxinas (moléculas baixo peso molecular produzida no metabolismo secundário) produzidas por cepas de fungos do gênero *Aspergillus* e classificadas segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC) como pertencentes ao grupo 1 de substâncias cancerígenas ao homem (IARC, 2002).

Diante disso, o monitoramento para identificar os níveis de qualidade microbiológica do ar em ambientes climatizados artificialmente, está determinado de acordo com a

Resolução RE Nº 9, de 16 de janeiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que define padrões referenciais técnicos de limpeza e manutenção de sistemas de ar condicionado, qualidade e monitoramento do ar interno para garantir a saúde e segurança de indivíduos que frequentam locais públicos e coletivos com ambientes climatizados. O valor máximo recomendável de contaminação microbiológica aceitável de $\leq 750 \text{ UFC/m}^3$ e de $\leq 1,5$ para relação entre o ar interno e externo e torna inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxigênicos (BRASIL, 2003).

Contudo, fungos são considerados fonte promissora para novas biomoléculas com atividades biológicas diversas para produção de enzimas e atividade antimicrobiana, devido à diversidade química e estrutural, especialmente dos fungos filamentosos que são os mais empregados para produção enzimática, além de possibilitar obtenção das enzimas em curto prazo, alta estabilidade e permitir manipulação genética para melhoramento visando escala industrial (SILVA *et. al*, 2015).

Biologicamente, as enzimas microbianas são eleitas pelas indústrias por apresentarem tempo de produção reduzido, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilização, bem como fácil manipulação genética (NAGARAJAN, 2012) e elevada diversidade bioquímica (SILVA *et. a.*, 2015). Entretanto, a utilização da enzima por parte das indústrias está relacionada especialmente à minimização de custos com produção (REINEHRA *et. al*, 2014) e com o resíduo e consumo elétrico, embora atualmente o comércio de enzimas tenha potencial para rentabilidade devido a busca por produtos de alta qualidade (SILVA *et. a.*, 2015).

As enzimas microbianas são relevantes no crescimento de bioprocessos industriais. Tornou-se imprescindível atualmente a busca por enzimas originais, aprimoradas e mais versáteis com o intuito de desenvolver sustentabilidade e processos de fabricação econômica e competitiva (ADRIO; DEMAIN, 2014). Além de enzimas, os fungos filamentosos são potenciais fontes de agentes antimicrobianos, sendo o gênero *Penicillium* o primeiro a ser descrito na literatura como produtor do antibiótico, penicilina (RAVAT *et. al*, 2011).

A biotecnologia utiliza os fungos como uma perspectiva de aplicação biológica para o surgimento de uma nova geração de antibióticos empregado como fonte natural renovável (CLEMENTINO *et. al*, 2015). Da mesma forma ocorre com os agentes antifúngicos no qual o desafio é encontrar novos agentes com amplo espectro que sejam seguros e, sobretudo eficientes (FERREIRA *et. al*, 2014). A dispersão e aparecimento de micróbios resistentes a antimicrobianos disponíveis no comércio são descritos na literatura há anos, impulsionando assim a procura por fontes de substâncias com ação antimicrobianas eficazes (SANTOS *et.*

al, 2014) e neste sentido, diversas pesquisas tem sido desenvolvidas com a finalidade de intervir, impedir ou intensificar a ação de drogas terapêuticas convencionais à resistência bacteriana (CATÃO *et. al*, 2014).

Não foi encontrado na literatura trabalhos testando a antimicrobiana, utilizando micélios e líquidos metabólitos de fungos filamentosos anemófilos, de modo que este pode ser o primeiro relato para este tipo de atividade. Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica do ar, a presença de fungos aflatoxigênicos nos ambientes climatizados da Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória e produção enzimática e atividade antimicrobiana.

Material e Métodos

Amostragem e coleta do ar

O estudo foi realizado na Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV) e constituído por 82 ambientes climatizados artificialmente, composto por 3 amostras da diretoria, 9 amostras da biblioteca, 1 do auditório, 15 salas de aulas, 34 laboratórios, 13 salas administrativas, 1 sala da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (CIPA), 5 núcleos de assistência estudantil, 1 gabinete docente e área externa localizada no pátio da entrada principal do CAV para quantificação de fungos. Foram excluídos do estudo os ambientes não climatizados.

As amostras foram coletadas da área central dos ambientes através da técnica de sedimentação passiva (LACAZ *et. al*, 1998) sobre meio de cultura sólido, usando placas de Petri contendo os meios de cultura Ágar Extrato de Malte (MEA) acrescido de Cloranfenicol e Ágar *Aspergillus Flavus e Parasiticus* (AFPA) para cultivos de fungos totais e fungos aflatoxigênicos, respectivamente. As placas foram dispostas a um metro de altura do chão e abertas durante 15 minutos para deposição de bioaerossóis, contendo microrganismos presentes no ar atmosférico. As placas foram incubadas em temperatura ambiente (28 ± 2 °C) por até quatro dias.

Análise microbiológica do ar

Após crescimento das culturas fúngicas foi realizada a quantificação das colônias presentes nos respectivos meios de cultura e calculada a relação entre o ar interno e externo (I/E) para determinar a qualidade do ar interno. A ANVISA determina o valor máximo

recomendável de contaminação microbiológica aceitável de ≤ 750 UFC/m³ e de $\leq 1,5$ para relação entre o ar interno e externo (BRASIL, 2003).

A amostragem por sedimentação não determina diretamente o número de microorganismos presentes num dado volume de ar, mas é possível transformar os resultados deste método (nº de UFC/unidade de área) em nº de UFC/unidade de volume (MORAIS *et al.*, 2010). O cálculo da amostragem de ar por sedimentação foi realizado usando a seguinte equação descrita por Friberg *et. al* (1999):

$$\text{Nº de UFC/m}^3 = \frac{\text{Nº de UFC na placa}}{\text{Área da placa de Petri (m}^2\text{)}} \times \frac{1}{23} \text{ (SAR)}$$

Onde, é necessário conhecer a área da placa de Petri 90 x 15 mm (nosso estudo – 0,006m²). SAR é razão entre o número de microrganismos no ar e na superfície do meio de cultura. Para ambientes com sedimentação espontânea e sem aparelho que force a sedimentação do ar, essa razão é 1: 23 (MORAIS *et al.*, 2010).

Identificação dos fungos aflatoxigênicos

Foi avaliada a possibilidade de presença cepas aflatoxigênicas, reveladas pelo reverso laranja do meio de cultura AFPA. A ANVISA torna inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxigênicos em ambientes climatizados artificialmente (BRASIL, 2003).

Isolamento, identificação e preservação dos fungos

Após o crescimento dos fungos no meio de cultura sólido MEA, as colônias fúngicas foram purificadas no mesmo meio de cultura. Em seguida, foi realizada a identificação da espécie fúngica, observando características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas) (SAMSON; FRISVAD, 2004) através de cultivo sob lamínula (RIDELL, 1950) e preservados de acordo com o método de Castelani - água destilada e imersão de culturas puras sob óleo mineral. Por fim, repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultura sólido MEA a fim de ser depositada cada espécie identificada no acervo da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

Determinação da atividade enzimática

Para determinar a atividade enzimática dos fungos isolados do ar, foram utilizadas 14 espécies identificadas [*Paecilomyces variotti* (04), *Penicillium fellutanum* (06), *Aspergillus flavus* (09), *Aspergillus parasiticus* (14, 20, 27 e 67), *Aspergillus sydowii* (18), *Talaromyces purpurogenus* (21 e 28), *Aspergillus japonicus* (24), *Penicillium oxalicum* (25), *Penicillium chrysogenum* (26) e *Curvularia luneta* (49)] para a produção de lipase, amilase e protease, seguindo a metodologia de Menezes e Hanlin (2004). Foram feitos discos de micélio de colônias fúngicas e repicadas para a área central da placa de Petri contendo meios de cultura sólidos específicos para cada enzima e incubadas por cinco dias em temperatura ambiente. Os testes foram realizados em triplicata para cada meio de cultura.

A leitura da reação enzimática da lipase foi através da visualização da presença de cristais de sal de cálcio do ácido láurico e/ou a formação de área clara no entorno do disco da colônia fúngica. Para revelação da produção de amilase, foi utilizada solução de iodo 0,1N, possibilitando a identificação da reação enzimática através de um halo translúcido no entorno da colônia. Para protease, devido a reação química foi possível visualizar a formação de halo translúcido ao redor da colônia. Após a revelação das reações enzimáticas, foi medido halo de atividade enzimática para determinar o potencial de produção das colônias, que é proporcional ao diâmetro do halo.

Determinação da atividade antibacteriana

Das espécies identificadas, 5 líquidos metabólicos provenientes das espécies *Paecilomyces variotti* (04), *Aspergillus japonicus* (24), *Talaromyces purpurogenus* (28), *Curvularia luneta* (24), *Aspergillus parasiticus* (67)] foram selecionadas aleatoriamente para realizar a atividade antimicrobiana e determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bacteriostática (CMB). Foram cultivados discos de micélios fúngicos purificados em 10 mL de meio de cultura líquido caldo sabouraud (CS) e incubados em temperatura ambiente por 20 dias. Após este período, o líquido metabólito foi separado do micélio através de filtração em papel filtro estéril. O líquido metabólico foi armazenado a 4 °C para realizar os testes de atividade antibacteriana e o micélio foi congelado para extração posterior de metabólitos.

Foram utilizadas para a atividade antimicrobiana as cepas das bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa e Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Staphylococcus aureus* ORSA (Resistente à Oxacilina). As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina 0,85% e obteve-se concentração de $1,5 \times 10^{-5}$ UFC/mL, obtendo-se a partir de diluição da suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Foram testados cinco líquidos metabólicos produzidos por fungos filamentosos oriundos do ar atmosférico. Todo experimento foi realizado em triplicata.

O teste de atividade antibacteriana foi realizado conforme método de diluição em caldo da norma técnica da ANVISA M7-A6. Foram realizadas diluições seriadas dos líquidos metabólicos. Foram realizados controle positivo do teste usando antibiótico cloranfenicol à 0,05 mg/mL e controle negativo do teste, na ausência de antibiótico, além do teste de esterilidade do líquido metabólico. Após distribuição das suspensões bacterianas, as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado em todos os poços a solução de 20 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (2% v/v) diluído em água para revelação do teste, após duas horas de incubação a temperatura ambiente, observou-se ou não crescimento bacteriano. Os poços corados em vermelho indicam crescimento bacteriano (RAHMAN *et. al*, 2004).

A coloração vermelha é resultante da reação do TTC com íons de hidrogênio constituído devido à respiração celular, gerada por uma solução insolúvel e avermelhada denominada de formazan, indicando células bacterianas viáveis no meio (RAHMAN *et al*. 2004).

A leitura da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizada através da observação visual da menor concentração dos líquidos metabólicos que teve ação para inibir o crescimento bacteriano. Em seguida foi realizado o teste de Concentração Mínima Bactericida (CMB), onde foi semeado material com auxílio de alça estéril de 1µL do poço onde houve inibição visual do crescimento bacteriano e dos poços anteriores a ele. O repique foi feito para placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton (HM), sendo a placa incubada a 37°C por 24h. Após esse período, foi observada se houve ou não crescimento bacteriano, indicando ação bactericida ou bacteriostática do líquido metabólico fúngico, pois os poços que não apresentam atuação antimicrobiana coraram em vermelho.

Os líquidos metabólitos utilizados no estudo foram testados em seu estado bruto após filtração. Portanto, a atividade antimicrobiana levou em consideração às concentrações inibitórias definidas para o método em µL/mL, após diluição seriada: 500,00; 250,00; 125,00; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81 3,91; 1,95 e 0,97µL/mL.

Resultados e Discussão

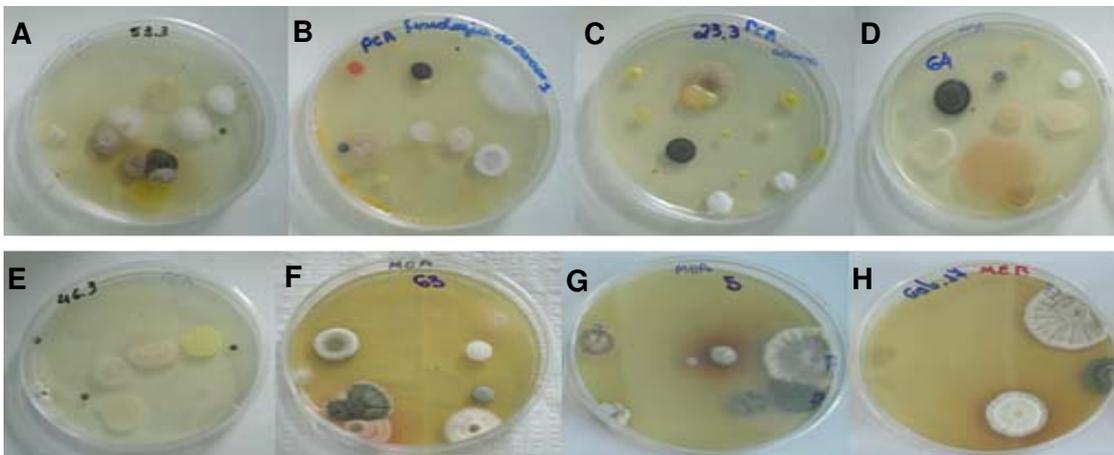
Foi observado crescimento de fungos em todos os ambientes, o que apresentou menor quantidade de UFC/m³ foi a sala de aula (14) e com maior quantidade e diversidade de colônia de fungos foram o espaço farmácia viva, sala da CIPA e o gabinete docente, apresentando todos 290 UFC/m³ de ar conforme tabela 1. No entanto, todos os ambientes avaliados do CAV apresentaram-se dentro dos limites permitidos pela ANVISA para qualidade microbiológica do ar (≤ 750 UFC/m³). Foi observada diversidade de colônias fúngicas provenientes de vários ambientes, as figuras 1 e 2 mostram as colônias antes e após purificação dos isolados fúngicos, respectivamente.

Tabela 1. Quantificação de unidades formadoras de colônias fúngicas (UFC) provenientes do ar nos meios de cultura MEA e AFPA e relação ar interno e externo (I/E) dos ambientes do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV.

Ambientes avaliados	MEA UFC/m ³	AFPA	Relação I/E	Ambientes avaliados	MEA UFC/m ³	AFPA	Relação I/E	Ambientes avaliados	MEA UFC/m ³	AFPA	Relação I/E
Pós-Graduação	137	-	0,7	Sala 03	123	-	0,6	Coordenação dos Laboratórios	36	-	0,2
Secretaria Geral dos Cursos	237	-	1,1	Central de Segurança	29	-	0,1	Lab. Semiol./Aval. Clínica	138	-	0,7
CIOF	65	-	0,3	Sala 04	188	-	1,0	Lab. Emerg. e Enf. Cirúrgica	94	-	0,5
Núcleo de Biológica	115	-	0,6	Sala 05	43	-	0,2	Lab. Urgência e Emergência	181	-	1,0
Núcleo de Nutrição	58	-	0,3	Sala 06	130	-	0,7	Laboratório de Semiologia 1	72	-	0,4
Núcleo de Saúde Coletiva	29	-	0,2	Biotério	123	-	0,6	LABEMI	152	-	0,8
Núcleo de Enfermagem	87	-	0,5	Laboratório de Anatomia 1	29	-	0,1	Lab Fisiologia do Exercício 1	72	-	0,4
Secretaria Geral (Diretoria)	72	-	0,4	Laboratório de Genética	36	-	0,2	Lab Fisiologia do Exercício 2	152	-	0,8
Diretoria	87	-	0,5	Laboratório de Anatomia 2	167	-	0,9	Auditório	44	-	0,2
Vice-diretoria	51	-	0,3	Lab. Micro e Imunologia	51	-	0,3	NAEPS - Médico do Trabalho	145	-	0,8
NATI	22	-	0,1	Espaço Farmácia Viva	290	-	1,5	NAEPS - Recepção e Arquivo	51	-	0,3
Núcleo de Educação Física	51	-	0,3	Laboratório Multifuncional 1	51	-	0,3	NAEPS - Equipe Psicossocial	138	-	0,7
Escolaridade	108	-	0,6	Laboratório de Microscopia 3	123	-	0,6	NAEPS – Atend. Individual	116	-	0,6
Sala de Informática	22	-	0,1	Laboratório de Parasitologia	65	-	0,3	Sala dos Motoristas	65	-	0,3
Sala 13	65	-	0,3	Laboratório Multifuncional 2	145	-	0,8	PET – Conexões de Saberes	152	-	0,8
NEP	58	-	0,3	Lab. de Técnica Dietética	36	-	0,2	D. A. (Diretório Acadêmico)	65	-	0,3
Biblioteca – Adm. do térreo	87	-	0,5	Lab. Bromatologia	101	-	0,5	Lab. Tec. dos Alimentos	101	-	0,5
Biblioteca/Estudo do térreo	94	-	0,5	Lab. Microbiol. de Alimentos	138	-	0,7	NAFPF	65	-	0,3
Biblioteca/Acervo	80	-	0,4	Lab. Tec. em Biomateriais	101	-	0,5	Lab. de Ensino de Biologia	87	-	0,5
Biblioteca/Estudo 1º andar	260	-	1,4	Sala de Rítmica	80	-	0,4	Laboratório de Bioprocessos	130	-	0,7
Biblioteca/Estudo (grupo 1)	101	-	0,5	Sala de Judô/Karatê	116	-	0,6	SIM	87	-	0,5
Biblioteca/Sala de pesquisa	246	-	1,3	Sala de Musculação	188	-	1,0	Lab. de Pesq. Ens. de Biologia	160	-	0,8
Biblioteca/Sala de vídeo	181	-	1,0	Lab. de Fisiologia do Esforço	58	-	0,3	Sala 8	94	-	0,5
Biblioteca/Coleção consulta	65	-	0,3	Laboratório Biodiversidade	80	-	0,4	Sala 9	58	-	0,3
Biblioteca/Administração	65	-	0,3	Lab. Biotecnol. e Fármaco	58	-	0,3	Sala 10	51	-	0,3
Lab. Fisiol. e Farmacologia	29	-	0,1	Laboratório de Microscopia 1	275	-	1,5	Sala 11	87	-	0,5
Sala 01	80	-	0,4	Laboratório de Microscopia 2	109	-	0,6	Gabinete professor	290	-	1,5
Sala 02	14	-	0,07	CIPA	290	-	1,5				

Legenda: CIOF: Coordenação de Infraestrutura, Orçamento e Finanças, TI: Núcleo de Apoio e Tecnologia da Informação, NEP: Núcleo de Pesquisa e Extensão, TECNOBIO: Laboratório de Técnica em Biomateriais, CIPA: Comissão Interna de Prevenção de Acidentes, NAEPS: Núcleo de Assistência Estudantil e Apoio Psicossocial, SIM: Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, NAFPF: Laboratório Nutrição, Atividade Física e Plasicidade Fenotípica, LABEMI: Laboratório de Enfermagem Materno-Infantil.

Figura 1 Diversidade de colônias de bioaerossóis do ar de diferentes ambientes do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV



Legenda: Comissão Interna de Prevenção de Acidente - CIPA (A), Laboratório de Fisiologia do Esforço (B), Biblioteca - sala de coleção de consulta (C), Laboratório de Enfermagem Materno-Infantil - LABEMI (D), Laboratório de Técnica Dietética (E), Laboratório de Semiologia 2 e Avaliação Clínica (F), Núcleo de Nutrição (G), Biblioteca - hall de estudo do térreo (H).

Figura 2 Diversidade de colônias após purificação dos isolados de fungos de diferentes ambientes do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV



A contaminação observada nos ambientes avaliados está possivelmente associada aos acessos, fluxo de ventilação e de transeuntes nos ambientes, pois a atmosfera exterior é influenciada pelo clima, enquanto a atmosfera interior sofre influência manutenção predial.

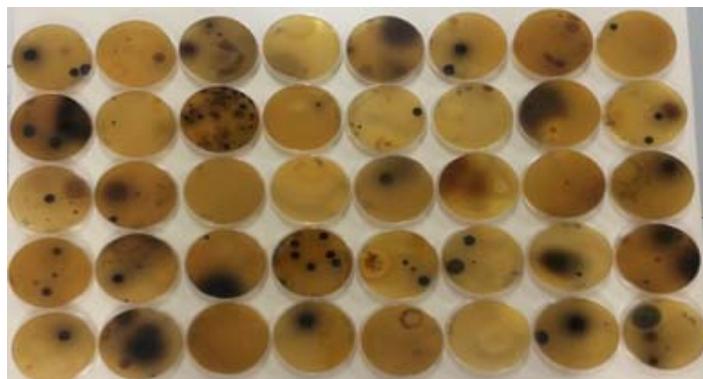
Nos dois ambientes há influência das atividades humanas, umidade e pouco de temperatura, uma vez que muitos fungos de interiores crescem em ampla variação de temperatura (ARAÚJO; CABRAL, 2010).

A relação de quantificação de fungos do ar I/E (interno/externo) dos ambientes pesquisados no CAV (Tabela 1) atendeu a legislação vigente da ANVISA para qualidade do ar de ambientes climatizados ($\leq 1,5$), variando essa relação 0,1 a 1,5, o mínimo e máximo, respectivamente, uma vez que a quantificação do ar externo foi de 188 UFC/m^3 .

Os ambientes que apresentaram relação I/E no limite máximo aceitável foram: hall de entrada da biblioteca, espaço farmácia viva, sala da CIPA e laboratório de microscopia 1 e sala docente. A explicação para esse resultado está no fato de que o hall de entrada da biblioteca ser ambiente mais frequentado pelos visitantes, apresentando a atividade humana influência direta na quantidade de bioaerossóis. O laboratório farmácia viva manipula amostras de plantas e solo onde os fungos desses lugares podem contribuir para a composição dos fungos do ar. A sala da CIPA é um ambiente usado para reuniões. E a sala do professor também é um ambiente relativamente frequentado por alunos e por ser espaço pequeno sofre influência da atividade humana nesse local. Nesses ambientes supracitados, os valores da quantificação de fungos no ar em UFC/m^3 estavam abaixo do permitido pela ANVISA (750), mas a relação I/E estava no limite.

Nenhum ambiente apresentou fungos aflatoxigênicos (Figura 3) estando em conformidade com a legislação supracitada que estabelece ausência de fungos patogênicos e toxigênicos no ar de ambientes internos.

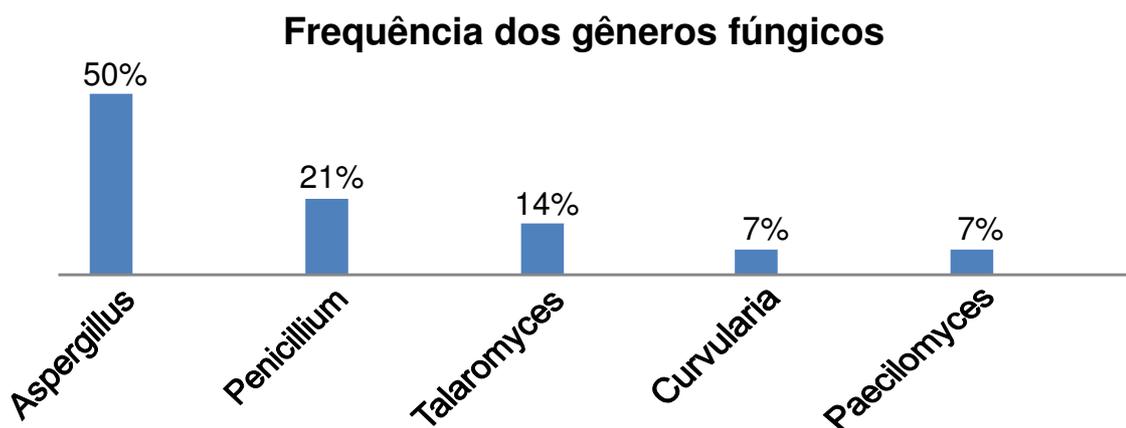
Figura 3. Detecção negativa de fungos aflatoxigênicos no ar do CAV em meio AFPA (ausência de cor laranja no reverso das colônias fúngicas).



Diferente do observado no nosso estudo, Aboul-Nasr *et. al*, (2013) encontraram fungos com potencial toxigênicos isolados de unidade terapia intensiva em hospital na Índia. Dos 110 isolados fúngicos obtidos do ar desse ambiente hospitalar, 79 isolados foram testados por cromatografia de camada fina (TLC) e pelo menos uma micotoxina foi produzida por algum desses 79 isolados. Sendo várias as micotoxinas detectadas por TLC, sendo as principais aflatoxinas, zearalenona, gliotoxina, fumigilina, entre outras. Sabe-se que produzir micotoxina é um fator de virulência.

A frequência dos gêneros fúngicos encontrados no ar dos ambientes analisados do CAV, cujas amostras foram possíveis identificar o fungo foram: *Aspergillus* (50%), *Penicillium* (21%), *Talaromyces* (14%), *Curvularia* e *Paecilomyces* (7% cada) conforme mostra o gráfico 1.

Gráfico 1. Frequência dos gêneros fúngicos encontrados no ar dos ambientes analisados do CAV.



A ocorrência de infecções por fungos anemófilos é bastante conhecida na literatura médica e os esporos inalados do ar têm sido incriminados como responsáveis por diversos problemas alérgicos (FURTADO; FERRARONI, 1998). Além dos casos de alergia, muitos fungos oportunistas como os apresentados no gráfico acima são responsáveis por doenças desde otites, micotoxicoses, infecções urinárias, onicomicoses, infecções oculares até fungemias. Fato este bastante preocupante à clínica médica, pois tais micro-organismos estão dispersos abundantemente no meio ambiente (GRUMACH, 2001). Por isso, a monitorização do ambiente para detectar potenciais focos patogênicos para prevenir epidemias e proteger a saúde pública requer uma abordagem rápida, sensível e de confiança que permita detectar microrganismos (ZHOUG *et. al*, 2000).

Biotecnologicamente, fungos são considerados fonte promissora para novas biomoléculas com atividades biológicas diversas para produção de enzimas e atividade antimicrobiana, devido à diversidade química e estrutural (SILVA *et. al*, 2015).

A maioria dos estudos com qualidade do ar foi realizado em ambientes hospitalares. Azimi *et. al* (2013) analisaram qualidade microbiologia do ar hospitalar e encontraram entre as 120 amostras 70% das amostras contendo fungo do gênero *Penicillium* sp, 14% dos ambientes apresentaram *Aspergillus* sp., 12% *Cladosporium* sp., 25 *Alternaria* sp, indicando fator de risco para pacientes e profissionais usuários desses ambientes. Esse resultado difere um pouco do encontrado no nosso estudo, uma vez que além do ambiente analisado ser diferente, o gênero mais frequente foi *Aspergillus*.

Poucos estudos foram realizados em ambiente universitário, sendo a maioria realizada em bibliotecas universitárias ou escolas em virtude da influência da qualidade do ar na saúde das crianças. A biblioteca de universidades é estudada em função de ser um ambiente muito movimentado diariamente e sempre climatizado. Os resultados em tela para a biblioteca do CAV são semelhantes com o estudo de Nascimento (2011) que ao analisar a qualidade do ar interno da biblioteca pública da cidade de São Carlos/SP, não encontrou irregularidades que confrontassem a legislação da ANVISA.

As 14 salas de aula do CAV apresentaram-se com valores abaixo de 750 UFC/m³. Contudo, os resultados deste estudo divergem dos apresentados por Moraes (2010) que ao avaliar a qualidade microbiológica do ar em salas de aulas de uma instituição de ensino superior evidenciou que 51% das salas de aulas apresentaram contaminação superior que o instituído pela ANVISA.

Stryjakowska – Sekulska *et. al* (2007) estudaram nove ambientes da Universidade de Poznan na Polônia. Foram amostrados duas salas de aula, laboratório de química, biblioteca, cantina, banheiros e diretoria. Todos os ambientes foram avaliados em dois momentos do dia, manhã e tarde, durante dois anos. Os autores encontraram em geral para todos os ambientes, maior quantidade de bactérias e fungos no período da tarde, possivelmente devido ao aumento de pessoas frequentando esses ambientes ao longo do dia. Eles observaram os seguintes gêneros fúngicos pela ordem de prevalência nos ambientes: *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Epicocum* sp. Esse resultado está em acordo com o nosso, uma vez que *Aspergillus* e *Penicillium* também foram os gêneros mais frequentes no ar do CAV e de acordo com Agarwal e Chakrabarti (2010) estes gêneros, bem como *curvularia* são os primeiros colonizadores de superfícies e interiores.

Pantoja *et. al* (2007) estudaram cinco locais (sala de aula, biblioteca central, almoxarifado, praça alimentação e área preservada) do Campus da Universidade Estadual do Ceará, Campus Itaperi. Dentre os 18 gêneros isolados dos ambientes avaliados, os mais comumente encontrados foram *Aspergillus* sp. (78%), *Penicillium* sp. (30%) e *Fusarium* sp. (22%). Os ambientes que os autores encontraram mais biocontaminados foram sala de aula e biblioteca central, indicando a importância da atividade humana como principal fator influenciador da contaminação da microbiota nesses ambientes.

Tanto no trabalho descrito por Pantoja *et. al* (2007) quanto no trabalho de Gambale *et. al* (1993), as bibliotecas foram os ambientes mais biocontaminados, porém com menor diversidade de gêneros fúngicos. Mas em ambos, o gênero mais prevalente foi *Aspergillus* sp., corroborando com nossos resultados. Vale ressaltar que Pantoja *et. al* (2007) encontraram muitos gêneros fúngicos porque o método de coleta, embora tenha sido sedimentação passiva, extrapolou o tempo de coleta de ar recomendado geralmente na literatura mundial que é 15 minutos, sendo as amostras coletadas por 12h.

A preocupação em encontrar os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em ambientes internos e climatizados artificialmente se dá mediante a algumas espécies contidas nestes gêneros serem produtoras de metabólitos secundários com efeito tóxico à saúde (PELUQUE, 2014; VISAGIE *et. al*, 2014). A exposição dos indivíduos a micotoxinas pode provocar reações que incluem hemorragias e necroses, e em abundância essas toxinas têm afinidade por alguns órgãos ou tecidos específicos como fígado, rins e sistema nervoso, sendo esses os mais comprometidos (IARC, 2002).

Kalwasinska *et. al* (2012) avaliaram ambientes funcionais e não funcionais de uma biblioteca universitária em Torun na Polônia. Segundo os autores, o ar interno foi considerado de baixo risco devido a contaminação encontrada de acordo a legislação do país, tanto nos ambientes funcionais (sala de aula, sala de leitura de periódicos, sal de conservação de coleção), quanto nos ambientes não-funcionais (banheiro, cafeteria), diferente dos resultados encontrados pelo nosso estudo nos quais todos os setores da biblioteca do CAV analisados apresentaram-se abaixo do limite estabelecido pela ANVISA (Tabela 1).

Para Boff (2011) os ambientes com aglomerados fúngicos são influenciados por fatores ambientais como variáveis de temperatura, umidade, corrente de ar, substratos orgânicos disponíveis, condições climáticas e variação sazonal, e por fatores físicos compreendidos pela forma, tamanho e densidade das partículas, entre outras situações que corroboram para o aumento dos conídios no ambiente (BOFF, 2011).

Ejdys *et. al* (2013) estudaram a composição fúngica do ar de salas de aula de escola e monitoraram por quatro anos, classificando de acordo com nível de biossegurança. Os autores isolaram 151 espécies de fungos, sendo 22 espécies classe 2 e 61 espécies de fungos foram classificadas como classe 1 de risco biológico.

Hayleeyesus e Manye (2014) estudaram bibliotecas universitárias da Etiopia e observaram que o nível de contaminação do ar foi considerada para algumas alto risco, de acordo com a legislação do país, com concentrações de fungos variando entre 367 a 2.595 UFC/m³, sendo os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. os mais frequentemente encontrados em concordância com os resultados encontrados para a biblioteca e demais ambientes do CAV.

Muitas espécies de fungos, incluindo as que estão presentes no ar podem ser responsáveis pela produção de vários metabólitos com as mais variadas aplicações industriais e biológicas, dentre elas atividades enzimáticas e antimicrobianas (VIRIATO, 2014).

No entanto, as fontes de obtenção para estudar atividades biológicas são solo, água, plantas e mais recentemente ambientes marinhos, explorando o metabolismo secundário com finalidade de realizar testes utilizando líquidos e extratos metabólicos ou metabólitos isolados por cromatografia. Os fungos existentes no ar atmosférico contendo uma gama de poluentes é um ambiente ainda inexplorado para isolamento de fungos que possam conter alguma atividade biológica.

Dos fungos oriundos do ar, foram isolados inicialmente 67 espécimes e em seguida realizado teste com 14 isolados após identificação morfológica para determinar a atividade enzimática para produção de amilase, lipase e protease. As espécies de fungos filamentosos identificados no ar do CAV foram *Paecilomyces variotti*, *Penicillium fellutanum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sydowii*, *Talaromyces purpurogenus*, *Aspergillus japonicus*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium chrysogenum* e *Curvularia luneta* (Tabela 2).

Para determinar a atividade enzimática dos fungos isolados do ar, foram utilizadas 14 espécies identificadas [*Paecilomyces variotti* (04), *Penicillium fellutanum* (06), *Aspergillus flavus* (09), *Aspergillus parasiticus* (14, 20, 27 e 67), *Aspergillus sydowii* (18), *Talaromyces purpurogenus* (21 e 28), *Aspergillus japonicus* (24), *Penicillium oxalicum* (25), *Penicillium chrysogenum* (26) e *Curvularia luneta* (49)] para a produção de lipase, amilase e protease

Tabela 2. Identificação das espécies dos fungos isolados no ar do CAV/UFPE.

Identificação das espécies dos fungos filamentosos	Código de identificação do isolado fúngico
<i>Paecilomyces variotti</i>	(04)
<i>Penicillium fellutanum</i>	(06)
<i>Aspergillus flavus</i>	(09)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	(14), (20), (27) e (67)
<i>Aspergillus sydowii</i>	(18)
<i>Talaromyces purpurogenus</i>	(21) e (28)
<i>Aspergillus japonicus</i>	(24)
<i>Penicillium oxalicum</i>	(25)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	(26)
<i>Curvularia lunata</i>	(49)

Dentre as espécies testadas para atividade enzimática, *Aspergillus sydowii* apresentou melhor resultado para produção de amilase (6 mm), lipase (14 mm) e protease (5 mm). Outras duas espécies produziram as três enzimas (*A. parasiticus* e *Penicillium fellutanum*), porém com menor atividade. Apenas três isolados pertencentes a três espécies foram negativos para as 3 enzimas simultaneamente, a saber: *Paecilomyces variotti* (04), *A. parasiticus lunata* (20) e *Curvularia lunata* (49).

Nem todos os isolados de uma espécie fúngica possuem obrigatoriamente a mesma enzima e na mesma intensidade. Por isso, foi observado no nosso estudo que embora os isolados 14, 27 e 67 sejam pertencentes a mesma espécie *A. parasiticus*, não foi observado mesma reação enzimática entre eles. Pois, o isolado 27 só produziu lipase e os isolados 14 e 67 produziram todas as três enzimas, os mesmos resultados para os isolados de *Talaromyces purpurogenus*.

As espécies de fungos que apresentaram as melhores atividades amilolíticas foram: *P. fellutanum* – 06 (7 mm) e *P. oxalicum* – 25 (7 mm), e atividade de lipase foram: *A. parasiticus* (10 mm) e *A. sydowii* (14 mm). Já a produção de protease, embora a de menor intensidade para as espécies produtoras, teve o isolado 18 de *A. sydowii* como melhor produtor (5 mm), conforme a tabela 3. A intensidade da produção de enzimas em substrato sólido pode sofrer influência direta da solubilidade, difusibilidade, tamanho da enzima, entre outros fatores.

Tabela 3. Identificação das espécies e produto metabólico de fungos isolados no ar do CAV/UFPE e halo de atividade enzimática (em mm).

Cód.	Espécie e produto metabólico	Halo e atividade enzimática (em mm)		
		A	L	P
04	<i>Paecilomyces variotti</i>	-	-	-
06	<i>Penicillium fellutanum</i>	+ (7 mm)	+ (5 mm)	+ (1 mm)
09	<i>Aspergillus flavus</i>	+ (6 mm)	-	-
14	<i>Aspergillus parasiticus</i>	+ (5 mm)	+ (10 mm)	+ (2 mm)
18	<i>Aspergillus sydowii</i>	+ (6 mm)	+ (14 mm)	+ (5 mm)
20	<i>Aspergillus parasiticus</i>	-	-	-
21	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	+ (4 mm)	+ (6 mm)	-
24	<i>Aspergillus japonicus</i>	-	+ (2 mm)	-
25	<i>Penicillium oxalicum</i>	+ (7 mm)	-	+ (1 mm)
26	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+ (6 mm)	-	+ (4 mm)
27	<i>Aspergillus parasiticus</i>	-	+ (3 mm)	-
28	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	+ (7 mm)	-	-
49	<i>Curvularia luneta</i>	-	-	-
67	<i>Aspergillus parasiticus</i>	+ (5 mm)	+ (4 mm)	+ (2 mm)

Legenda: (Cód.) Código de identificação do isolado fúngico, (mm) Milímetro, (A) Amilase, (L) Lipase, (P) Protease, (+) Produziu atividade enzimática, (-) Não produziu atividade enzimática.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que atividade amilolítica foi a mais comum entre as espécies, corroborando com o achado de Wenzel *et. al* (2013) que avaliou fungos endofíticos de soja e revelou maior quantitativo de atividade enzimática para a amilase (83,3% - 20). Silva *et. al* (2006) ao avaliar fungos endofíticos de pinha não observou qualquer atividade amilásica entre os fungos testados.

Os halos de reação de amilase no nosso estudo variaram entre 4 e 7 mm estando acima dos resultados encontrados por Firmino e Furtado (2014) que ao testar a produção de amilase pelos isolados do fungo *Ceracystis* spp. obtiveram halo de até 1 mm, enquanto que os estudos de Tavares *et. al* (2012) que observaram halos de 29 mm avaliando *Aspergillus* isolados de noni (*Morinda citrifolia* L).

Fungos filamentosos isolados do solo e húmus, plantas e bagaço de cana de açúcar foram avaliados quanto a capacidade de produção da enzima amilase em diferentes regiões do estado de São Paulo mostrou que 23 isolados fúngicos apresentaram potencial para produção enzimática (GUIMARÃES *et. al*, 2006).

Um estudo realizado por Soares *et. al* (2010) para produção de amilase, sugerem que os fungos diante de condições estressantes sofrem influências que interferem na produção enzimática. Firmino e Furtado (2014) também avaliaram atividade de lipase com isolados do fungo *Ceracystis* spp. e não observaram nenhuma atividade para essa enzima. Os autores testaram também a protease e os halos não ultrapassaram de 1 mm.

As médias de atividades enzimáticas do nosso estudo divergem dos resultados apresentados por Griebeler *et. al* (2015) que encontraram valores superiores para os halos de amilase, acima de 7,08 mm e acima de 10,62 mm para protease. Esses autores trabalharam com fungos isolados de diferentes fontes, tais como solo, óleo de oliva e de soja, queijos, extrato de tomate, nata de leite, carne, farelo de soja e meios de cultura contaminada, estando o estudo em tela aquém para as mesmas atividades enzimáticas.

Um estudo avaliou fungos isolados em sementes, casca e polpa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) e observou que nenhum dos fungos teve atividade proteolítica, mas que todos conseguiram apresentar alguma atividade amilolítica e lipolítica (MOLINA *et. al*, 2012). A avaliação realizada por Bezerra *et. al* (2012) com isolados de uma planta da Caatinga (*Opuntia ficus-mil*) revelou que uma cepa de *Aspergillus japonicus* não produziu atividade proteolítica, corroborando com o nosso estudo. Para Sumitha *et. al* (2013) a produção enzimática se diferencia entre fungos e tem relação com o habitat onde é encontrado.

Aboul-Nasr *et. al* (2013) testaram 110 isolados fúngicos do ar de unidade de terapia intensiva e sala de cirurgia de Hospital na Índia e observaram que dentre os 110 isolados testados, 73% produziram protease, 92% lipase e 78% urease, sendo esse estudo o único assinalado na literatura testando o potencial enzimático e de produção de micotoxinas de fungos anemófilos. Dentre os isolados produtores de lipase e protease estavam *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Myrothecium* sp e *Fusarium* sp. Segundo os autores, esses resultados são importantes, uma vez que proteases e lipases têm papel durante a infecção microbiana e sugere que a função é digerir lipídeos de membrana do hospedeiro pelo patógeno. E protease degrada tecidos do pulmão, sendo sugerido como um dos eventos envolvidos na fisiopatogênese da infecção por *A. fumigatus* que junto com *A. flavus*, produtor de aflatoxinas é conhecido por secretar protease.

Em relação aos testes de atividade antibacteriana dos fungos isolados do ar do CAV, três líquidos metabólicos apresentaram atividade contra todas as bactérias testadas,

representados pelas espécies *Paecilomyces variotti* (04), *Talaromyces purpurogenus* (28) e *A. parasiticus* (67). O líquido metabólico de *Curvularia lunata* (49) não apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias testadas (Tabela 3).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória da atividade antibacteriana das espécies de fungos isolados no ar do CAV/UFPE.

Espécie e Produto Metabólico	Produto Metabólico Fúngico							
	Menor concentração Mínima Inibitória (µL/mL)							
	01	02	03	04	05	06	07	08
<i>Paecilomyces variotti</i> (04)	+	+	+	+	+	+	+	+
	(500)	(500)	(500)	(250)	(500)	(500)	(500)	(500)
<i>Aspergillus japonicus</i> (24)	+	+	+	+	-	+	+	-
	(500)	(500)	(500)	(250)		(500)	(500)	
<i>Talaromyces purpurogenus</i> (28)	+	+	+	+	+	+	+	+
	(250)	(125)	(125)	(125)	(250)	(125)	(125)	(250)
<i>Curvularia lunata</i> (49)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus parasiticus</i> (67)	+	+	+	+	+	+	+	+
	(500)	(500)	(500)	(250)	(500)	(500)	(250)	(500)

Legenda: Código das bactérias: (1) *Escherichia coli* (ATCC 25922), (2) *Shigella flexneri* (ATCC 12022), (3) *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), (4) *Serratia marcescens*, (5) *Klebsiella pneumoniae*, (6) *Pseudomonas aeruginosa*, (7) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e (8) *Staphylococcus aureus* ORSA.

(+) Inibiu crescimento bacteriano, (-) Não inibiu crescimento bacteriano.

O líquido metabólico proveniente da espécie *Talaromyces purpurogenus* (isolado 28) foi o que apresentou melhor atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, chegando a concentração mínima inibitória de 125µL/mL. Contudo, nenhum dos líquidos metabólicos testados apresentou ação bactericida, apenas bacteriostática.

Duarte (2006) relata que não há consenso acerca do que é aceitável quando se trata de nível de inibição para atividade antimicrobiana relacionada a produtos naturais frente a antibióticos padrões, de modo que alguns autores consideram apenas resultados semelhantes a antibióticos, embora outros entendam que níveis elevados de inibição são um bom potencial.

O estudo realizado por Paraginskia et. al, (2014) analisou todas as cepas bacterianas avaliadas no nosso estudo, mas utilizou concentrações diferentes dos compostos triazenos para atividade antimicrobiana e obteve resultado de ação bacteriostática em pelo menos um dos seis compostos avaliados.

Concluindo que os ambientes analisados no Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV) apresentaram grande diversidade de espécies de fungos, mas atenderam as exigências da resolução da ANVISA. Foi verificado também que não apresentou fungos potencialmente prejudiciais à saúde humana no ar dos ambientes climatizados. O nosso estudo demonstrou que algumas espécies de fungos filamentosos anemófilos são capazes de produzir as enzimas amilase, lipase e protease. Entretanto os fungos *Aspergillus parasiticus* Speare e *Aspergillus sydowii* (Bain. & Sart) Thom & Church destacam-se por apresentar melhor potencial amiolítico entre as demais espécies e enzimas sob as condições deste experimento. A atividade antimicrobiana da espécie *Talaromyces purpurogenus* foi a que apresentou melhor resultado, no entanto, mostrou baixo potencial bactericida.

Referências

ABOUL-NASR et. al, Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. **SpringerPlus**. v. 2, n. 347, p. 01-06, 2013.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**. v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AGARWAL, R.; CHAKRABARTI, A. Epidemiology of allergic bronchopulmonary Aspergillosis. In: PASQUALOTTO A. C. (Ed.). Aspergillosis: from diagnosis to prevention. New York: **Springer Science**. Biomedical and Life Sciences. p. 671-688, 2010.

ARAÚJO, R.; CABRAL, J. P. Fungal air quality in medical protected environments. In KUMAR, A. (Ed.). **Air Quality**. p. 357-382, 2010.

AZIMI, F.et. al, Fungal air quality in hospital rooms: a case study in Tehran, Iran. **Journal of Environmental Health Sciences & Engineering**. v. 11, n. 30, p. 01-04, 2013.

BEZERRA, J. D. et. al, Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, n. 5, p. 1989-1995, 2012.

BOFF, C. 2011. **Monitoramento de fungos no ar de unidades de terapia intensiva**. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pneumológicas) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; **Norma Aprovada M7-A6**. 6. ed. v. 23, n.2, p. 1-81. 2003

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003**. Determinar a publicação de orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor, sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. 2003.

CATÃO, R. M. R. et. al, Atividade antibacteriana e efeito interativo in vitro de um produto a base de cranberry sobre *Escherichia coli*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v. 35, n. 4, p. 723-729, 2014.

CLEMENTINO, L. C. et. al, Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da coating. **Evidência**, Joaçaba, v. 15, n. 1, p. 37-56, 2015.

EJDYS, E. et. al, An Overview of the Species of Fungi Occurring in School Rooms – a Four-Year Study. **Pol. J. Environ. Stud**. v. 22, n. 6, p. 1691-1700, 2013.

FERREIRA, M. P. S. B. C. et. al, Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob**. v. 13, n. 26, p. 01-06, 2014.

FIRMINO, A. C.; FURTADO, E. L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. **Summa Phytopathol**. v. 40, n. 4, p. 371-374, 2014.

FRIBERG, B., FRIERG, S., BURMAN, L. G. Correlation between surface and air count of particles carrying bacteria in operating rooms with turbulent ventilation. **Journal of Hospital Infection**. v. 42, p. 61-68, 1999.

FRÖHLICH-NOWOISKYA, J.et. al, High diversity of fungi in air particulate matter. **PNAS**. v. 106, n. 31, p. 12814-12819, 2009.

FURTADO, M. S.S.; FERRARONI, J. J. Fungos anemófilos em ambientes hospitalares da cidade de Manaus. **Revista Amazonas Ciência e Cultura**. V. 34, p. 42-47, 1998.

GAMBALE, W.et. al, Library fungi at the university of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**. v. 3, n. 2, p. 45-50, 1993.

GRIEBELER, N. E. et. al, Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Rev. Acad. Ciênc. Anim.** v. 13, p. 15-24, 2015.

GRUMACH, A. S. **Alergia e imunologia na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu. P. 16-21, 2001.

GUIMARÃES, L. H.et. al, Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

HAYLEYESUS, S. F.; MANAYE, A. M. Microbiological Quality of Indoor Air in University Libraries. **Asian Pac J Trop Biomed**. v. 4(Suppl 1), p. S312-S317, 2014.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicine, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Monograph Eval. Carcinog. Risks Human**. v. 82, p. 1-556, 2002.

KALWASIŃSKA, A., BURKOWSKA, A., WILK, I. Microbial air contamination in indoor environment of a university library. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 19, n. 1, p. 25-29, 2012.

LACAZ, C. S. et. al, **Guia para identificação de fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

MENEZES, M.; Hanlin, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2. ed. Recife PE. Imprensa Universitária, UFRPE, 2004.

MOLINA, G. et. al, Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**. v. 27, p. 289-294, 2012.

MORAIS, G. R. et. al, Qualidade do ar interno em uma instituição de ensino superior brasileira. **Bioscience Journal**. v. 26, p. 305-310, 2010.

NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. **Appl. Biochem. Biotechnol**. v. 168, n. 5, p. 1163-1196, 2012.

NASCIMENTO, G. C. 2011. **Avaliação da qualidade do ar em ambientes internos: biblioteca pública**. 170 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2011.

OLIVEIRA, L. D. C.; BORGES-PALUCHA, L. R. Alergias respiratórias: uma revisão dos principais fungos anemófilos e fatores desencadeantes. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v. 39, n. 2, p. 426-441, 2015.

PANTOJA, L. D. M., COUTO, M. S., PAIXÃO G. C. Diversidade de bioaerossóis presentes em ambientes urbanizados e preservados de um campus universitário. **Biológico, São Paulo**. v. 69, n. 1, p. 41-47, 2007.

PARAGINSKIA, G. L. et. al, Atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade frente à *artemia salina* leach. de alguns compostos triazenos. **Quim. Nova**. v.37, n. 7, p. 1138-1144, 2014.

PELUQUE, E. 2014. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereias comercializados no Brasil**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RAHMAN, M. et. al, Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

RAVAT, F. et. al. Antibiotics and the burn patient. **Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures (SFETB)**. v. 1, n. 16, p. 16-26, 2011.

RÊGO, C. M.; SANTOS, F. S. Ocorrência de fungos anemófilos e sua relação com fatores abióticos em Barreiras, Bahia. **Rev. Bras. Bioci.** v.13, n. 4, p. 265-271, 2015.

REINEHRA, C. O. et. al, Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**. v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

RIDDEL, R. W. **Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture mycology**. v. 42, p. 265-270, 1950.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Penicillium Subgenus Penicillium: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extralites. – **Stud. Mycol.** v. 49, p. 1-260, 2004.

SANTOS, L. A. et. al, Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da planta *Plectranthus ornatus codd* (boldo chinês). **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 12, n. 1, p 119-129, 2014.

SILVA, E. P. et. al, Screening of filamentous fungi from Brazilian rainforests for enzyme production. **African Journal of Microbiology Research**. v. 9, n. 5, p. 332-342, 2015.

SILVA, R. L. O. et. al, Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha. **Acta Botânica Brasileira**. v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SOARES, I. A. et. al, Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

STRYJAKOWSKA-SEKULSKA, M. et. al, Microbiological Quality of Indoor Air in University Rooms. **Polish J. of Environ. Stud**. v. 16, n. 4, p. 623-632, 2007.

SUMITHA, V. H.; NIRMALA DEVI, D.; SRINIVAS, C. Extracelullar enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**. v. 9, n. 1, p. 1-9, 2013.

TAVARES, A. C. D. et. al, Extracellular enzymes of anamorphic fungi isolated from *Morinda Citrifolia* L. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 1, n. 2, p. 1-6, 2012.

VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. **O Mundo da Saúde**. v. 38, n. 1, p. 40-50, 2014.

VISAGIE, C. M. et. al, Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 343-371, 2014.

WENZEL, J. B. et. al, Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Pesq. Online: Biol. & Saúde**. v. 9, n. 3, p. 1-15, 2013.

YASSIN, M. F.; ALMOUQATEA, S. Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. **Int. J. Environ. Sci. Tech**. v. 7, n. 3, p. 535-544, 2010.

ZIEHE, É. M. et. al, Determinação da contaminação fúngica do ar em creches públicas do Rio de Janeiro/RJ. **Vigilância Sanitária em Debate**. v. 2, n. 1, p. 51-56, 2014.

ZHOUG, G.; WHONG, Z.W.; ONG, T.; CHEN, B. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in a indoor environment. **Molecular and Cellular Probes**. 2000; 14: 339-348.

3 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A quantificação de fungos do ar tem sido realizada para avaliação da qualidade microbiológica de ambientes fechados em áreas administrativas, acadêmicas e hospitalares. Mas há apenas um relato na literatura de aplicação de atividade biológica para espécies de fungos do ar. Esse potencial ainda não explorado torna-se fonte interessante de fungos com aplicação na produção industrial.

Com os resultados do presente trabalho, obtiveram-se as seguintes conclusões:

1. Todos os ambientes da UFPE/CAV apresentam biodiversidade de espécies fúngica, e não foi encontrado nenhum fungo toxigênico ou patogênico ao homem. Portanto, todos os ambientes climatizados atendem à legislação da ANVISA.
2. O maior potencial enzimático entre as três atividades enzimáticas avaliadas foi a lipolítica alcançada pelas espécies *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus parasiticus*.
3. Os líquidos metabólicos das espécies *Paecilomyces variotti*, *Talaromyces purpurogenus* e *Aspergillus parasiticus* apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias desafiadas, sendo a espécie *Talaromyces purpurogenus* a que obteve melhor resultado.
4. Fungos filamentosos do ar apresentam potencial para atividade enzimática e antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

AARTHY, M. et. al, Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chem. Eng. Res. Des.** v. 92, p. 1591-601, 2014.

ABOUL-NASR et. al, Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. **SpringerPlus.** v. 2, n. 347, p. 01-06, 2013.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules.** v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AGARWAL, R.; CHAKRABARTI, A. Epidemiology of allergic bronchopulmonary Aspergillosis. In: PASQUALOTTO A. C. (Ed.). Aspergillosis: from diagnosis to prevention. New York: **Springer Science.** Biomedical and Life Sciences. p. 671-688, 2010.

ARAÚJO, R.; CABRAL, J. P. Fungal air quality in medical protected environments. In KUMAR, A. (Ed.). **Air Quality.** p. 357-382, 2010.

AZIMI, F.et. al, Fungal air quality in hospital rooms: a case study in Tehran, Iran. **Journal of Environmental Health Sciences & Engineering.** v. 11, n. 30, p. 01-04, 2013.

BASTOS G. M. et. al, In vitro determination of the antimicrobial potential of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 32, n. 1, p. 113-120, 2011.

BÉRDY J. Bioactive microbial metabolites. **J Antibiot.,** v. 58, p. 1-26, 2005.

BEZERRA, J. D. et. al, Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 28, n. 5, p. 1989-1995, 2012.

BOFF, C. 2011. **Monitoramento de fungos no ar de unidades de terapia intensiva.** 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pneumológicas) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; **Norma Aprovada M7-A6**. 6. ed. v. 23, n.2, p. 1-81. 2003

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003**. Determinar a publicação de orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor, sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. 2003.

CABRAL, J. P. Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. **Sci. Total Environ.** v. 408, n. 20, p. 4285-4295, 2010.

CAMPOS, F. F. **Isolamento e identificação de substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos associados à *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)**. 2009. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CARÃO, Á. C. P. et. al, Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**. v. 44, n. 4, p. 699-705, 2014.

CATÃO, R. M. R. et. al, Atividade antibacteriana e efeito interativo in vitro de um produto a base de cranberry sobre *Escherichia coli*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 35, n. 4, p. 723-729, 2014.

CLEMENTINO, L. C. et. al, Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da caatinga. **Evidência**, Joaçaba, v. 15, n. 1, p. 37-56, 2015.

DABOOR, S. M. et. al, Extraction and purification of collagenase enzymes: A critical review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 6, n. 4, p. 239-263, 2010.

DAMIANO, D. K. et. Avaliações do DNA e do metabólito secundário produzido pelo fungo *trichoderma reesei* nas fases de crescimento. **Atlas de Ciências da Saúde**. v. 3, n. 2, p. 08-18, 2015.

DEB, P. et. al, Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **Springer Plus**. v. 2, p. 01-12, 2013.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**. v. 7, p. 1-16, 2006.

EJDYS, E. et. al, An Overview of the Species of Fungi Occurring in School Rooms – a Four-Year Study. **Pol. J. Environ. Stud.** v. 22, n. 6, p. 1691-1700, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Colheita, beneficiamento e armazenamento.** 2013. Disponível em: <www.embrapa.br> Acesso em: 10 jan. 2013.

FERREIRA, M. P. S. B. C. et. al, Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** v. 13, n. 26, p. 01-06, 2014.

FICANHA, A. M. M. et. al, Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Quim. Nova**, v. 38, n. 3, p. 364-369, 2015.

FIRMINO, A. C.; FURTADO, E. L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. **Summa Phytopathol.** v. 40, n. 4, p. 371-374, 2014.

FLORES, L. H.; ONOFRE, S. B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de saúde da cidade de Francisco Beltrão – PR. **Rev. Saúde e Biol.** v. 9, n. 52, p. 50-55, 2010.

FRIBERG, B., FRIERG, S., BURMAN, L. G. Correlation between surface and air count of particles carrying bacteria in operating rooms with turbulent ventilation. **Journal of Hospital Infection.** v. 42, p. 61-68, 1999.

FRÖHLICH-NOWOISKYA, J.et. al, High diversity of fungi in air particulate matter. **PNAS.** v. 106, n. 31, p. 12814-12819, 2009.

FURTADO, M. S.S.; FERRARONI, J. J. Fungos anemófilos em ambientes hospitalares da cidade de Manaus. **Revista Amazonas Ciência e Cultura.** V. 34, p. 42-47, 1998.

GAMBALE, W.et. al, Library fungi at the university of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.** v. 3, n. 2, p. 45-50, 1993.

GRIEBELER, N. E. et. al, Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Rev. Acad. Ciênc. Anim.** v. 13, p. 15-24, 2015.

GRUMACH, A. S. **Alergia e imunologia na infância e na adolescência.** São Paulo: Atheneu. P. 16-21, 2001.

GUIMARÃES, L. H. et. al, Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

GUPTA, R. et. al, Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HAWKSWORTH, D. L. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. **Med. Mycol.** v. 49 (Suppl1), p. 70-76, 2011.

HAYLEYESUS, S. F.; MANAYE, A. M. Microbiological Quality of Indoor Air in University Libraries. **Asian Pac J Trop Biomed**. v. 4(Suppl 1), p. S312-S317, 2014.

HSIAO, N-W. et. al, Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase. **R. Electron. J. Biotechnol. [online]**. v. 17, n. 2, p. 89-94, 2014.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicine, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Monograph Eval. Carcinog. Risks Human**. v. 82, p. 1-556, 2002.

JANG, K. W. et. al, Anthracimycin, a Potent Anthrax Antibiotic from a Marine-Derived Actinomycete. **Ang. Chem. Intern. Ed**. v. 52, n.20, p. 7822-7824. 2013.

KALWASIŃSKA, A., BURKOWSKA, A., WILK, I. Microbial air contamination in indoor environment of a university library. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 19, n. 1, p. 25-29, 2012.

KUDRYAVTSEVA, N. N. et. al, The influence of cultural medium composition on the proteolytic enzyme secretion of fungus *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 46, n. 3, p. 324-330, 2010.

LACAZ, C. S. et. al, **Guia para identificação de fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

LEHNINGER, A., NELSON, D. L., COX, M. M. **Bioquímica: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo, Sarvier, 2006. 1202. p.

MARIA, G.L., SRIDHAR, K.R.; RAVIRAJA, N.S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural Technology**. v. 1, p. 67-80, 2005.

MENEZES, M.; Hanlin, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2. ed. Recife PE. Imprensa Universitária, UFRPE, 2004.

MOLINA, G. et. al, Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**. v. 27, p. 289-294, 2012.

MORAIS, G. R. et. al, Qualidade do ar interno em uma instituição de ensino superior brasileira. **Bioscience Journal**. v. 26, p. 305-310, 2010.

MORENO, M. L. et. al, Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. **Life**. v. 3, n. 1, p. 38-51, 2013.

NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 168, n. 5, p. 1163-1196, 2012.

NAKAMURA, M.; IKETANI, A.; SHIOI, Y. A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. **Mycoscience**. v. 52, n. 4, p. 234-241, 2011.

NASCIMENTO, G. C. 2011. **Avaliação da qualidade do ar em ambientes internos: biblioteca pública**. 170 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2011.

NUNES, L. G. 2013. **Avaliação da qualidade do ar interno de salas de aula**. 67f. Monografia (Engenheiro Ambiental) – Universidade do Vale do Itajaí. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Santa Catarina, Itajaí, 2013.

OLIVEIRA, L. D. C.; BORGES-PALUCHA, L. R. Alergias respiratórias: uma revisão dos principais fungos anemófilos e fatores desencadeantes. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v. 39, n. 2, p. 426-441, 2015.

ORLANDELLI, R. C. et. al, Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.** v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PANTOJA, L. D. M., COUTO, M. S., PAIXÃO G. C. Diversidade de bioaerossóis presentes em ambientes urbanizados e preservados de um campus universitário. **Biológico, São Paulo**. v. 69, n. 1, p. 41-47, 2007.

PARAGINSKIA, G. L. et. al, Atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade frente à *artemia salina* leach. de alguns compostos triazenos. **Quim. Nova**. v.37, n. 7, p. 1138-1144, 2014.

PATHAK, S.; NARULA, N. Optimization of pH for the production of amylase by soil mycotic flora of Jabalpur region. **Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 2, n. 1, p. 17-22, 2013.

PELUQUE, E. 2014. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereias comercializados no Brasil**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

QUEIROZ, D. S. et. al, Efeito do solvente na atividade enzimática de lipases comerciais imobilizadas. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: COBEQ, 2014. p. 01-08.

RAHMAN, M. et. al, Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

RAVAT, F. et. al. Antibiotics and the burn patient. **Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures (SFETB)**. v. 1, n. 16, p. 16-26, 2011.

RÊGO, C. M.; SANTOS, F. S. Ocorrência de fungos anemófilos e sua relação com fatores abióticos em Barreiras, Bahia. **Rev. Bras. Bioci.** v.13, n. 4, p. 265-271, 2015.

REINEHRA, C. O. et. al, Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**. v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

RIDDEL, R. W. **Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture mycology**. v. 42, p. 265-270, 1950.

SABOTIC, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors-current and potential applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 93, p. 1351-1375, 2012.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Penicillium Subgenus Penicillium: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extralites. – **Stud. Mycol.** v. 49, p. 1-260, 2004.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Org. Process Res. Dev.** v. 15, n. 1, p. 224–230, 2011.

SANTOS, L. A. et. al, Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da planta *Plectranthus ornatus codd* (boldo chinês). **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 12, n. 1, p. 119-129, 2014.

SANTOS, S. N. **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Cobretum leprosum* do bioma Caatinga**. 2012. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2012.

SCHULZ, B. et. al, Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**. v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SILVA, E. P. et. al, Screening of filamentous fungi from Brazilian rainforests for enzyme production. **African Journal of Microbiology Research**. v. 9, n. 5, p. 332-342, 2015.

SILVA, R. L. O. et. al, Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha. **Acta Botânica Brasílica**. v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SOARES, I. A. et. al, Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SOUZA, P. M. et. al, A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SPECIANA, V. et. al, Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**. v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

STRYJAKOWSKA-SEKULSKA, M. et. al, Microbiological Quality of Indoor Air in University Rooms. **Polish J. of Environ. Stud.** v. 16, n. 4, p. 623-632, 2007.

SUMITHA, V. H.; NIRMALA DEVI, D.; SRINIVAS, C. Extracelullar enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**. v. 9, n. 1, p. 1-9, 2013.

TAVARES, A. C. D. et. al, Extracellular enzymes of anamorphic fungi isolated from *Morinda Citrifolia* L. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 1, n. 2, p. 1-6, 2012.

TINTINO, S. R. et. al, Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia* L. **Acta biol. Colomb.** v. 20, n. 3, p. 193-200, 2015.

TREICHEL, H. et. al, A review on microbial lípases production. **Food Bioprocess Technol.** v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. **O Mundo da Saúde**. v. 38, n. 1, p. 40-50, 2014.

VISAGIE, C. M. et. al, Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 343-371, 2014.

WENZEL, J. B. et. al, Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Pesq. Online: Biol. & Saúde**. v. 9, n. 3, p. 1-15, 2013.

YASSIN, M. F.; ALMOUQATEA, S. Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. **Int. J. Environ. Sci. Tech.** v. 7, n. 3, p. 535-544, 2010.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **N Biotechnol.** v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.

ZHENG, S.; WANG, H.; ZHANG, G. A novel alkaline protease from wild edible mushroom *Termitomyces albuminosus*. **Acta Biochimica Polonica**. v.58, n.2, p. 269-273, 2011.

ZIEHE, É. M. et. al, Determinação da contaminação fúngica do ar em creches públicas do Rio de Janeiro/RJ. **Vigilância Sanitária em Debate**. v. 2, n. 1, p. 51-56, 2014.

ZHOUG, G.; WHONG, Z.W.; ONG, T.; CHEN, B. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in a indoor environment. **Molecular and Cellular Probes**. 2000; 14: 339-348.