



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SUELLEN EMILLIANY FEITOSA MACHADO

BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO

Recife
2019

SUELLEN EMILLIANY FEITOSA MACHADO

**BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

- M149b Machado, Suellen Emilliany Feitosa
Bioprospecção de substâncias com potencial antimicrobiano produzidas por fungos filamentosos isolados do solo/ Suellen Emilliany Feitosa Machado. – 2019.
153 f. : il. fig., tab.
- Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndice e anexos.
1. *Aspergillus*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Biologia molecular. 4. Código de barras de DNA taxonômico. 5. Espectrometria de massas. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orientadora). II. Título.
- 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2020 - 018)

SUELLEN EMILLIANY FEITOSA MACHADO

**BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dr.^a Rejane Pereira Neves (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Luiz Nascimento de Araújo Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Roger Fagner Ribeiro Melo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais, Sávio e Rosália, por nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos e ao meu irmão, Samuel, por todo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de perseverança e sabedoria, por sempre me amparar e não me deixar desistir de realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Sávio e Rosália, e ao meu irmão, Samuel, pelo amor imensurável, por me incentivarem nas minhas conquistas e por nunca medir esforços para contribuir com minha formação pessoal e profissional. Aos meus sobrinhos, Clarice e Luiz, por serem fontes de amor, alegria e aconchego. Gratidão e amor!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima, pela confiança depositada em mim, por sua amizade e por me incentivar a crescer profissionalmente e pessoalmente. À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima, por todos os conhecimentos transmitidos, amizade, paciência e por me acolher no Laboratório de Genética de Micro-organismos.

A Paulo Victor, pelo amor, paciência, compreensão e incentivo. Obrigada por estar presente em todas as minhas conquistas.

Aos Professores Dr. Roger Melo (Departamento de Micologia - UFPE), Dr. Fábio Brayner e Dr. Luiz Carlos Alves (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA - UFPE) e à Patrícia Sobral (Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz - UFPE) pelas contribuições para a realização deste trabalho.

A Joanda Silva, Lucas Abreu e ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares (Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise - LMCA/ Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos IPeFarM /UFPB) pela realização de várias etapas que contribuíram de forma ímpar para a obtenção de diversos resultados.

Aos amigos Hanna Katarina, Pedro Bomfim e Iranildo Cruz, pela cumplicidade que nos fez colegas de laboratório e, acima de tudo, amigos. Obrigada pela ajuda nos testes e pelo companheirismo!

Aos colegas do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT), em especial Allana, César, Luiz, Rubhens, Ariany e Jamerson, pela ajuda na realização deste trabalho e principalmente pela acolhida e companheirismo sempre presentes.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Micro-organismos (LabGeM), em especial Glêzia, Wanda e Vinícius, pelo apoio e contribuição para a realização deste trabalho e por tornarem os fardos diários mais leves pela convivência diária sempre repleta de amor.

Aos Professores: Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva, Dr.^a Rejane Pereira Neves, Dr. Luiz Nascimento de Araújo Neto e Dr. Roger Melo, por aceitarem participar da banca avaliadora.

A todos os funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial a Fátima Regina, Marcela Sobral e Luiz Carlos.

A todos os meus amigos, que contribuíram de forma direta ou indireta nesta conquista e que torcem verdadeiramente pelo meu sucesso.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPE.

À FACEPE, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Fungos filamentosos possuem potencial biotecnológico por produzirem metabólitos com diversas atividades biológicas. A adaptação dos micro-organismos às drogas conduz ao desenvolvimento de cepas resistentes, reduzindo a eficácia de terapias. Este trabalho objetivou fazer uma bioprospecção de substâncias antimicrobianas produzidas por fungos filamentosos isolados do solo de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa – PB. A identificação dos fungos se deu por microcultivo em lâmina e técnicas moleculares. O potencial antimicrobiano foi investigado pelas técnicas de bloco de gelose e difusão em disco. As condições de cultivo de *Aspergillus terreus* URM 7731 foram avaliadas: meio, pH e tempo de cultivo. A cada 24h um frasco foi retirado para avaliar crescimento celular, pH e atividade antimicrobiana frente a cepas padrão e multidrogas resistentes (MDR) de *Staphylococcus aureus*. O líquido metabólico foi extraído com solventes orgânicos para avaliar as melhores condições de extração através da investigação das Concentrações Mínimas Inibitória e Bactericida (CIM/CMB). A interação do extrato bruto (EBDic) e antibióticos utilizados na clínica foi avaliada por *checkerboard*. Avaliou-se a capacidade de EBDic em inibir a formação de biofilme e o potencial antioxidante. EBDic foi fracionado por cromatografia em coluna. A fração que apresentou melhores resultados de CIM/CMB e EBDic foram submetidos a espectrometria de massas os resultados desta análise foram utilizados para construir as redes moleculares. Os 30 fungos isolados foram identificados como: *A. terreus* (8/30), *A. fumigatus* (7/30), *A. niger* (7/30), *Paecilomyces variotii* (4/30), *A. fischeri* (3/30) e *A. nidulans* (1/30). *A. terreus* URM 7731 apresentou os melhores resultados de inibição frente a *S. aureus* (13,0 mm: bloco de gelose; 20,5 mm: disco-difusão). As melhores condições de cultivo foram: meio extrato de malte a 1,5%, pH 8,0, 96 h. O solvente orgânico que melhor extraiu os metabólitos foi diclorometano (CIM e CMB=31,25µg/mL para *S. aureus* padrão e 500µg/mL para *S. aureus* MDR). EBDic reduziu a CIM de antibióticos frente a *S. aureus* multidrogas resistentes, apresentando efeitos sinérgicos ou parcialmente sinérgicos. Na concentração de 250µg/mL, EBDic reduziu em 20% a capacidade de *S. aureus* padrão produzir biofilme. A fração F-15 apresentou os menores valores de CIM/CMB em relação as demais frações. EBDic apresentou 98,12% de sequestro de radicais livres ABTS, representando boa atividade antioxidante. A rede molecular gerada de EBDic e de F-

15 no modo negativo originou 376 nodos, destacando-se a presença de emodina, butirolactona I, *sulchrin* e metil dicloroasterrate. No modo positivo, a rede gerou 731 nodos, destacando-se metil asterrate e ácido astérico. *A. terreus* URM 7731 possui atividade antimicrobiana contra *S. aureus* padrão e MDR, demonstrando perspectivas sobre o seu potencial biotecnológico. Novos experimentos são necessários a fim de isolar e purificar os compostos que possuem potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Atividade antimicrobiana. Biologia Molecular. Código de Barras de DNA Taxonômico. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Filamentous fungi have biotechnological potential due the production of metabolites with diverse biological activities. The adaptation of microorganisms to drugs leads to the development of resistant strains, reducing the effectiveness of therapies. This work aimed to realize a bioprospecting study about antimicrobial substances produced by filamentous fungi isolated from the soil of a coconut grove located in Varzeas de Sousa - PB. The identification of the fungi was done by microculture and molecular techniques. The antimicrobial potential was investigated by gel block and disk diffusion techniques. Culture conditions of *Aspergillus terreus* URM 7731 were evaluated: medium, pH and culture time. A flask was withdrawn every 24 hours to evaluate cell growth, pH, and antimicrobial activity against standard and *Staphylococcus aureus* multidrug resistant strains (MDR). The metabolic fluid was extracted with organic solvents to evaluate the best extraction conditions through the investigation of Minimal Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC/MBC). The interaction of the crude extract (EBDic) and antibiotics used in the clinic was evaluated by checkerboard. The ability of EBDic to inhibit biofilm formation and antioxidant potential were evaluated. EBDic was fractionated by column chromatography. The fraction that presented the best results of MIC/MBC and EBDic were submitted to mass spectrometry the results of this analysis were used to build the molecular networks. The 30 isolated fungi were identified as *A. terreus* (8/30), *A. fumigatus* (7/30), *A. niger* (7/30), *Paecilomyces variotii* (4/30), *A. fischeri* (3/30) and *A. nidulans* (1/30). *A. terreus* URM 7731 showed the best inhibition results against *S. aureus* (13.0 mm: gel block; 20.5 mm: disc-diffusion). The best growing conditions were: malt extract at 1.5%, pH 8.0, 96 h. The best organic solvent that extracted the metabolites was dichloromethane (MIC and MBC = 31.25µg/mL for *S. aureus* without resistance and 500µg/mL for MDR). EBDic reduced MIC for antibiotics against resistant MDR, exhibiting synergistic or partially synergistic effects. At the concentration of 250 µg/mL, EBDic reduced the ability of *S. aureus* to produce biofilm by 20%. The fraction F-15 presented the lowest values of MIC/MBC in relation to the other fractions. EBDic presented 98.12% of ABTS free radical sequestration, representing good antioxidant activity. The generated molecular network of EBDic and F-15 in the negative mode gave rise to 376 nodes, with emphasis on the presence of emodin, butyrolactone I, sulchrin and methyl dichloroasterrate. In the positive mode, the network generated 731 nodes, emphasizing methyl asterrate

and asteric acid. *A. terreus* URM 7731 has antimicrobial activity against standard *S. aureus* and MDR, demonstrating perspectives on its biotechnological potential. Further experiments are needed in order to isolate and purify compounds having antimicrobial potential.

Keywords: Antimicrobial activity. *Aspergillus*. DNA Barcoding. Mass spectrometry. Molecular Biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	(a) Representação ilustrativa de hifas contínuas (não-septadas) e septadas. (b) Septação regular de hifas (ver seta). (c) Reprodução assexuada nos fungos através de esporos assexuais (conídios), formados por hifas especiais (conidióforos).....	28
Figura 2 –	a) Conidióforo unisseriado de <i>Aspergillus</i> ; b) Conidióforo bisseriado de <i>Aspergillus</i>	31
Figura 3 –	Representação esquemática do conidióforo do fungo <i>P. variotii</i>	33
Figura 4 –	Fases do crescimento microbiano.....	35
Figura 5 –	Fórmulas estruturais de metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos.....	40
Figura 6 –	Fórmulas estruturais de metabólitos secundários produzidos por <i>Aspergillus terreus</i>	43
Figura 7 –	Região do rDNA com localização dos iniciadores para a amplificação de ITS1 e ITS2.....	45
Figura 8 –	Representação esquemática da técnica de microcultivo em lâmina proposta por Riddel, 1950 (com adaptações).....	51
Figura 9 –	Representação esquemática da técnica utilizada para caracterização ultra estrutural das espécies fúngicas por Microscopia Eletônica de Varredura (MEV).....	54
Figura 10 –	Representação esquemática do teste do bloco de gelose.....	57
Figura 11 –	Representação esquemática do método de disco difusão.....	58
Figura 12 –	Metodologia de obtenção dos extratos brutos a partir do caldo fermentado de <i>Aspergillus terreus</i> URM 7731.....	60
Figura 13 –	Metodologia de microdiluição para determinação da CIM dos extratos.....	61
Figura 14 –	Método do <i>checkerboard</i> , utilizado para avaliação do sinergismo entre o extrato bruto e os antibióticos.....	65

Figura 15 –	Esquema representativo da distribuição dos compostos na microplaca de 96 poços para investigação da inibição de formação de biofilme por EBDic.....	67
Figura 16 –	Representação esquemática da metodologia de avaliação do potencial anti-formação de biofilme.....	68
Figura 17 –	Número de espécies fúngicas isoladas nas Várzeas de Sousa-PB, identificadas por microcultivo em lâmina.....	75
Figura 18 –	<i>Aspergillus fischeri</i> URM 7737. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Cleistotécio (MO); D) Hifas e conídios (MEV).....	77
Figura 19 –	<i>Aspergillus fumigatus</i> URM 7811. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Conídios (MO); D) Conídios (MEV).....	77
Figura 20 –	<i>Aspergillus nidulans</i> URM 7810. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Cleistotécio (MO); D) Conídios (MEV).....	78
Figura 21 –	<i>Aspergillus niger</i> URM 7748. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Conídios (MO); D) Conídios (MEV).....	78
Figura 22 –	<i>Aspergillus terreus</i> URM 7731. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Conidióforos, com ênfase nas cadeias de conídios (MO); D) Conídios (MEV)	79
Figura 23 –	<i>Paecilomyces variotii</i> URM 7739. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Hifas (MO); D) Conídios (MEV).....	79
Figura 24 –	Produto da amplificação do gene ITS, correspondente a região ITS1-5.8S-ITS2 de isolados da espécie <i>Aspergillus terreus</i> , usando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4. (M: Marcador 1Kb plus DNA Ladder; CN: Controle Negativo; S18: URM 7732; S22: URM 7733; S23: URM 7742; S27: URM 7743).....	82
Figura 25 –	Árvore filogenética ‘ <i>Neighboor-Joining</i> ’ gerada a partir de fragmentos obtidos da região ITS rDNA de espécies de	

	<i>Aspergillus</i> isoladas de um coqueiral, em relação a micro-organismos depositados no <i>GenBank</i>	87
Figura 26 –	Árvore filogenética ‘ <i>Neighboor-Joining</i> ’ gerada a partir de fragmentos obtidos da região ITS rDNA de espécies de <i>Paecilomyces</i> isoladas de um coqueiral, em relação a micro-organismos depositados no <i>GenBank</i>	88
Figura 27 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR ITS1-IT4 de espécies de <i>Aspergillus</i> após digestão enzimática. A) Digestão enzimática dos produtos de PCR de URM 7811 (S4), URM 7735 (S7), URM 7736 (S8), URM 7816 (S24) e URM 7817 (S25) com <i>HhaI</i> . B) Digestão enzimática dos produtos de PCR de URM 7731 (S9), URM 7732 (S18), URM 7741 (S21), URM 7733 (S22) e URM 7742 (S23) com <i>MwoI</i> . M: Marcador DNA Ladder 100 bp.....	90
Figura 28 –	Gráficos dos halos de inibição (mm) produzidos por <i>Aspergillus terreus</i> URM 7731 frente a cepas de <i>S. aureus</i> padrão (UFPEDA-02) e MDR (UFPEDA-699, UFPEDA-709, UFPEDA-718, UFPEDA-731).....	97
Figura 29 –	Curvas de crescimento (g.L ⁻¹) de <i>Aspergillus terreus</i> URM 7731 em Caldo Czapek (CZ), Caldo Batata (BD) e Extrato de Malte em cultivo submerso, a 150 rpm, 30 °C, durante 120 horas.....	98
Figura 30 –	Representação das curvas de pH dos cultivos de <i>Aspergillus terreus</i> URM 7731 em Caldo Czapek (CZ), Caldo Batata (BD) e Extrato de Malte em cultivo submerso, a 150 rpm, 30 °C, durante 120 horas.....	100
Figura 31 –	Representação (em barras) do cultivo de <i>Aspergillus terreus</i> URM 7731 em Extrato de Malte a 1,5%, utilizando diferentes pH, a 150 rpm, 30 °C, durante 96 horas, frente a linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	101
Figura 32 –	Atividade anti-formação de biofilme de EBDic contra a linhagem <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA-02, utilizando 4	

	concentrações diferentes do extrato e Ampicilina (960 µg/mL) como controle negativo.....	110
Figura 33 –	Rede molecular do Extrato Bruto obtido com Diclorometano e da fração F-15, no modo negativo, demonstrando os principais <i>clusters</i> anotados.....	119
Figura 34 –	Anotações para os clusters A, B, C, e D.....	120
Figura 35 –	Comparação entre o espectro de m/z 423 [M-H] da rede molecular (preto) com o espectro da biblioteca disponível no GNPS para a molécula de butirolactona I (verde), no modo negativo, com as correspondências observadas entre eles.....	121
Figura 36 –	MS ² do íon m/z 425 [M+H]	122
Figura 37 –	Rede molecular do Extrato Bruto obtido com Diclorometano e da fração F-15, no modo positivo, e anotações para o cluster A.....	124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Exemplos de compostos industrialmente importantes produzidos por fungos filamentosos.....	38
Quadro 2 –	Metabólitos secundários isolados a partir de cultivos de diferentes linhagens de <i>Aspergillus terreus</i> , isoladas de locais distintos.....	41
Quadro 3 –	Componentes das reações de amplificação dos genes ITS 1 e 4 por PCR.....	52
Quadro 4 –	Volumes dos reagentes utilizados na digestão enzimática dos produtos de PCR dos fungos, utilizando as enzimas <i>HhaI</i> e <i>MwoI</i>	53
Quadro 5 –	Micro-organismos utilizados na investigação do potencial antimicrobiano dos fungos filamentosos isolados do solo de um coqueiral, localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fracionamento do extrato EBDic, gradiente de eluição utilizado e rendimento das frações.....	72
Tabela 2 –	Características macroscópicas das colônias do fungos crescidas em CYA (incubação a 25 °C, durante 168 horas).....	76
Tabela 3 –	Características microscópicas dos fungos cultivados em CYA (incubação a 25 °C, durante 168 horas).....	76
Tabela 4 –	Número de pares de base, homologia e similaridade entre os isolados e os gêneros depositados no banco de dados <i>Genbank</i>	84
Tabela 5 –	Tamanhos dos fragmentos (pb) dos produtos de PCR após digestão pelas enzimas <i>HhaI</i> e <i>MwoI</i> para espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Paecilomyces</i>	89
Tabela 6 –	Média aritmética dos halos de inibição (mm) dos isolados frente a micro-organismos de interesse clínico, utilizando a metodologia do bloco de gelose.....	92
Tabela 7 –	Médias aritméticas dos halos de inibição (mm) de isolados frente a micro-organismos de interesse clínico, utilizando a metodologia de disco difusão.....	94
Tabela 8 –	CIM e CMB dos extratos obtidos a partir da extração do líquido metabólico com solventes orgânicos: Hexano (EBHex), Diclorometano (EBDic) e Acetato de Etila (EBAcOEt).....	103
Tabela 9 –	Médias aritméticas (mm) dos halos de inibição produzidos por antibióticos frente a isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	105
Tabela 10 –	Resultados da avaliação do sinergismo entre o Extrato Bruto obtido com Diclorometano (EBDic) e os antibióticos, realizado utilizando o método do <i>checkerboard</i> , frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> Multidrogas resistentes (MDR).....	108

Tabela 11 –	Resultados de fenóis totais e atividades antioxidantes promovidas por EBDic, na concentração de 800 µg/mL.....	112
Tabela 12 –	Concentrações Mínimas Inibitórias (CIM) e Concentrações Mínimas Bactericidas (CMB) das 20 frações oriundas do fracionamento do extrato EBDic, utilizando cromatografia em coluna <i>flash</i> , frente a <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA-02.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
$\mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Microlitro por microlitro
μm	Micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	2,2- azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AcOEt	Acetato de Etila
apto.	Apartamento
BD	Caldo Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Ágar
B.O.D.	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BSTFA	(N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida)
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
ca.	cerca de
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CH_2Cl_2	Diclorometano
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMB	Concentração Bactericida Mínima
CIM:	Concentração Inibitória Mínima
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CYA	<i>Czapek Yeast Extract</i>
CZ	Caldo Czapek
DNA	Ácido Desoxorribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EBAcOEt	Extrato Bruto obtido com Acetato de Etila
EBDic	Extrato Bruto obtido com Diclorometano
EBHex	Extrato Bruto obtido com Hexano

ed.	Edição
EM	Caldo Extrato de Malte
et al.	e outro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
g.L ⁻¹	Gramas por Litro
GNPS	<i>Global Natural Product Social Molecular Networking</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HCl	Ácido clorídrico
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
ng.mL ⁻¹	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro (s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
Rf	Fator de Retenção
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rpm	Rotações por minuto

SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPEDA	Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	OBJETIVOS	25
1.1.1	Objetivo Geral	25
1.1.2	Objetivos Específicos	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	FUNGOS FILAMENTOSOS	27
2.1.1	<i>Aspergillus</i>	29
2.1.2	<i>Paecilomyces</i>	32
2.1.3	Metabólitos secundários produzidos por fungos	33
2.1.3.1	Metabólitos secundários produzidos por <i>Aspergillus terreus</i>	39
2.2	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS..	42
2.3	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	FUNGOS FILAMENTOSOS E REATIVAÇÃO	50
3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	50
3.2.1	Microcultivo em lâmina	50
3.2.2	Identificação molecular	51
3.2.2.1	Extração do DNA dos fungos	51
3.2.2.2	Amplificação e sequenciamento da região ITS	52
3.2.2.3	Caracterização molecular por PCR-RFLP	53
3.3	CARACTERIZAÇÃO ULTRA ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	54
3.4	NÚMEROS DE REGISTRO	55
3.5	SCREENING: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	55
3.5.1	Micro-organismos teste	55
3.5.2	Suspensões dos micro-organismos teste	55
3.5.3	Ensaio primário - Bloco de gelose	56
3.5.4	Ensaio secundário – Disco difusão	57
3.6	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO	58
3.7	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	59
3.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	60

3.9	PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA	62
3.10	DETERMINAÇÃO DO SINERGISMO <i>IN VITRO</i> ENTRE O EXTRATO BRUTO E ANTIBIÓTICOS MÉTODO DO <i>CHECKERBOARD</i>	62
3.11	ATIVIDADE ANTIBIOFILME: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO BRUTO AO BIOFILME EM FORMAÇÃO	66
3.12	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	68
3.12.1	Determinação do teor de fenóis totais	68
3.12.2	Atividade Antioxidante Total (AAT)	69
3.12.3	Atividade de eliminação de radicais DPPH	69
3.12.4	Atividade de eliminação de cátions radicais ABTS	70
3.12	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	71
3.12.1	Cromatografia em Coluna <i>flash</i>	71
3.12.2	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)	72
3.12.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE/EM)	73
3.12.4	Rede molecular	73
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5	CONCLUSÃO	126
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICE A - REGISTROS DAS LINHAGENS DOS FUNGOS NO GENBANK E NA MICOTECA URM, IDENTIFICADOS UTILIZANDO CARACTERES MACRO E MICROSCÓPICOS E AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8SrDNA-ITS2	142
	ANEXO A - BDA: BATATA DEXTROSE AGAR	143
	ANEXO B - CYA: CZAPEK-YEAST AGAR	144
	ANEXO C - BD: CALDO BATATA DEXTROSE	145
	ANEXO D - EXTRATO DE MALTE	146
	ANEXO E - CZAPEK MODIFICADO	147
	ANEXO F - BHI: <i>BRAIN HEART INFUSION</i>	148
	ANEXO G - ÁGAR SABOURAUD	149

ANEXO H - ÁGAR MUELLER HINTON	150
ANEXO I - CALDO MUELLER HINTON	151
ANEXO J - TBE: TRIS-BORATO-EDTA	152
ANEXO K - TAMPÃO DE AMOSTRA	153

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre os recursos da biodiversidade é essencial para compreender a natureza, e a avaliação acerca do consumo sustentável pode aumentar economicamente o crescimento de uma região ou de um país. Estima-se que existam 100 milhões de espécies diferentes que coabitam o planeta. Cerca de 2% dessas espécies são conhecidas pela comunidade científica, incluindo diferentes espécies da fauna, flora e micro-organismos (CORRÊA et al., 2018).

Os micro-organismos compreendem muito da biodiversidade terrestre e desempenham funções importantes nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento dos ecossistemas (BELL et al., 2005), exercendo controle biológico e biorremediação nos ambientes em que vivem, com potencial biotecnológico reconhecido. Contudo, a magnitude da biodiversidade microbiana ainda não é conhecida e, conseqüentemente, o potencial a ser explorado é imenso. De acordo com Silva et al. (2014), o Brasil é considerado o país mais rico do mundo em termos de biodiversidade, porém é um dos menos estudados quando se refere ao seu potencial químico-farmacológico.

Nos estudos de bioprospecção, por vezes, um número considerável de micro-organismos é coletado. Porém, para entender a microbiota do ambiente e/ou explorar o potencial biotecnológico dos micro-organismos, é necessário identificá-los. Diversos métodos são utilizados para identificar micro-organismos, como a identificação fenotípica e as técnicas moleculares. Atualmente, é comum encontrar estudos que utilizam mais de um método para proceder a identificação.

Os fungos filamentosos são um grande grupo de organismos ubíquos e de interesse biológico, pois representam uma fonte inestimável de compostos bioativos. Muitas espécies produzem metabólitos úteis, como pigmentos, enzimas, vitaminas e antibióticos, enquanto algumas outras espécies são infecciosas e causam doenças. Por esse motivo, pesquisadores têm estudado as espécies de fungos não apenas para compreender doenças em humanos e plantas, mas também para identificar metabólitos para fins industriais (IWASHITA, 2002; SCHORBELE et al, 2013; ALBERTI et al., 2017). (ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017)

Segundo Smith et al. (2015), estudos farmacológicos e medicinais de fungos mostraram que os basidiomicetos e ascomicetos constituem uma fonte imensa de componentes biologicamente ativos, como agentes antimicrobianos e antioxidantes.

De acordo com Guimarães et al. (2010), várias razões justificam a necessidade urgente por novos agentes antibióticos: doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; altas taxas de resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso.

A descoberta de novos produtos naturais bioativos como condutores do desenvolvimento terapêutico pode ser inspirada pelo conhecimento etnofarmacológico, ou alcançada através da triagem de uma coleção de extratos para bioatividade (NOTHIAS et al., 2018). Os testes *in vitro* e *in vivo* para a descoberta de extratos ou compostos isolados a partir de diferentes fontes naturais é uma forma comum de descobrir metabólitos biológicos ativos (SENTHIL-RAJAN et al., 2013).

Assim, conhecendo as propriedades biotecnológicas dos fungos filamentosos e sua importância na busca de substâncias ativas entre seus metabólitos com potencial terapêutico, este trabalho visa verificar a produção de agentes antimicrobianos por diferentes espécies de fungos, além de desenvolver meios para obter rendimentos satisfatórios de metabólitos através da avaliação das condições de cultivo e analisar a constituição química de extratos, obtendo uma visão geral de moléculas potencialmente ativas presentes nessas amostras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral:

Realizar um estudo de bioprospecção de fungos filamentosos, visando identificar substâncias com potencial antimicrobiano.

1.1.2 Objetivos específicos:

- Identificar os fungos filamentosos coletados e isolados;
- Analisar os perfis de restrição para diferenciação intra-específica;
- Selecionar o(s) possível(eis) fungo(s) que apresente(m) atividade antimicrobiana frente a micro-organismos de interesse clínico;

- Determinar as melhores condições de cultivo para a produção dos metabólitos de interesse, utilizando o isolado que apresentar os melhores resultados;
- Obter extratos brutos dos caldos fermentados e promover partições líquido:líquido dos mesmos;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos para selecionar o melhor solvente orgânico a ser utilizado nas extrações dos metabólitos secundários;
- Avaliar, frente a micro-organismos de interesse clínico, o tipo de interação entre o extrato bruto e agentes antimicrobianos disponíveis na prática clínica;
- Avaliar a capacidade do extrato bruto de inibir a formação de biofilme bacteriano;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato bruto;
- Realizar o fracionamento do extrato bruto utilizando técnicas cromatográficas e determinar A CIM e a CMB das fases particionadas;
- Obter dados de espectrometria de massas do extrato bruto e das frações e analisa-los através do sistema de redes moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos estão entre os organismos mais importantes do mundo, tanto pelos papéis vitais que exercem no ecossistema como pela influência sobre os seres humanos e em atividades relacionadas ao homem. São eucarióticos, heterotróficos e altamente eficientes na degradação de uma grande variedade de substratos. Sua nutrição ocorre por absorção, pois secretam enzimas no ambiente e depois absorvem os nutrientes restantes da digestão (BENNETT, 1998; MUELLER; SCHMIT, 2007).

Podem ser encontrados em associação com outras espécies (por exemplo, líquens ou micorrizas), como patógenos de animais e plantas ou como sapróbios de vida livre. Estão dispersos no meio ambiente, em vegetais, no ar atmosférico, solo e água (ANVISA, 2004; MUELLER; SCHMIT, 2007), porém, a maioria deles é terrestre, vive no solo ou sobrevive em cadáveres de organismos multicelulares, como plantas e animais, contribuindo para a reciclagem ambiental (KHAN et al., 2014).

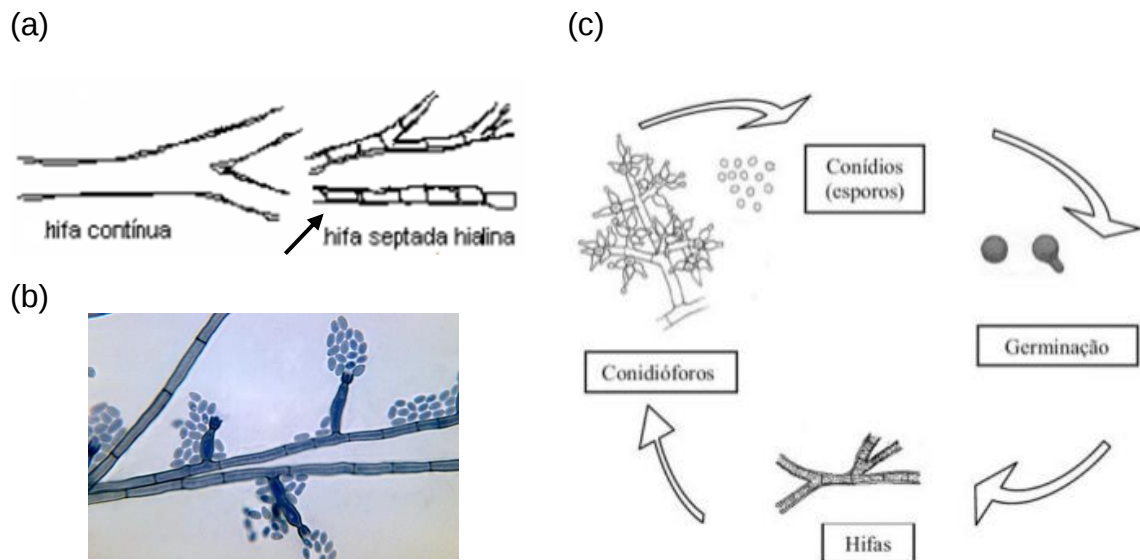
Em números, igualam-se aos animais e superam as plantas. Ademais, Esposito e Azevedo (2010) afirmam que, excluindo-se os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes. Paguigan et al., 2016 acrescentam que, embora existam cerca de 5,1 milhões de espécies fúngicas no mundo, menos de 100 mil foram cultivadas e/ou descritas até os dias atuais.

Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ter septação regular (fungos superiores) ou septos formados eventualmente, para oclusão de regiões do micélio (fungos inferiores). A partir da hifa ou de esporângios, sexuais ou assexuais, formam-se esporos, estruturas responsáveis pela propagação das espécies. Na grande maioria dos fungos, os esporos podem ser chamados de conídios (ANVISA, 2004).

Os esporos, estruturas que resistem a radiação ultravioleta (UV), dessecação, pressão, calor e frio, quebram a dormência e começam a germinar ao encontrar condições favoráveis. A germinação é o mecanismo que transforma o esporo do estado biológico dormente, proporcionando o crescimento vegetativo do organismo. Logo, o esporo é uma estrutura de reprodução sexual ou assexual. Na reprodução assexual a velocidade com que os esporos podem ser produzidos e disseminados é alta, o que representa uma vantagem. Por mais que seja um processo mais longo,

a reprodução sexuada proporciona variação genética na população (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018). Estas características são ilustradas a seguir, na Figura 1.

Figura 1- (a) Representação ilustrativa de hifas contínuas (não-septadas ou cerocíticas) e septadas (apocíticas). (b) Septação regular de hifas (ver seta). (c) Reprodução assexuada nos fungos através de esporos assexuais (conídios), formados por hifas especiais (conidióforos)



Fontes: (a) ANVISA (2004); (b) *Public Health Image Library* (PHIL) (disponível em: <https://phil.cdc.gov/>; acesso em 01/12/2018); (c) Machado et al., 2012.

Tais micro-organismos são encontrados em quase toda a natureza, o que demonstra sua capacidade de adaptação a uma variedade de ambientes. Quanto à habilidade de crescer em quase todos os habitats da Terra, são superados apenas pelas bactérias na capacidade de suportar condições extremas de temperatura e escassez de fontes nutricionais. Considera-se que as regiões tropicais possuem a maior diversidade para a maioria dos grupos de organismos, incluindo os fungos (BLACKWELL, 2011; JIANG et al., 2013; STÜBINGER et al., 2016).

Muitas vezes, os fungos filamentosos são reconhecidos como causadores de sérios problemas no campo agrícola, veterinário, médico e nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. Na agricultura e na indústria de alimentos, são responsáveis pela deterioração de matérias-primas e alimentos processados, além de apresentarem-se como risco para a saúde devido à sua capacidade de produzir alérgenos e micotoxinas, bem como causadores de micoses (BENNETT, 1998;

FISHER et al., 2012; HAUGLAND et al., 2004; JIANG et al., 2013; LECELLIER et al., 2014).

Fungos filamentosos presentes no meio ambiente hospitalar podem causar infecções em pacientes imunocomprometidos. Membros dos gêneros filogeneticamente relacionados *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* estão entre os fungos encontrados nestes ambientes internos (HAUGLAND et al., 2004). Porém, o gênero *Aspergillus* (principalmente as espécies *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*) é o mais citado na literatura como fungo oportunista, especialmente em pacientes transplantados de medula óssea e neutropênicos. A inalação de esporos é a via mais comum de transmissão e os surtos de aspergilose são associados a reformas e construções, dentro e ao redor de hospitais (ANVISA, 2004). Nomura et al. (2016) afirmam que, em seres humanos, principalmente imunocomprometidos, as doenças fúngicas são difíceis de tratar porque os fungos estão mais intimamente relacionados com animais do que outros organismos.

Apesar deste impacto negativo, muitas espécies de fungos são reconhecidamente importantes pelos aspectos industriais e biotecnológicos. Outras são particularmente relevantes para a humanidade, especialmente nos campos da biotecnologia, agricultura, medicina, segurança alimentar e no controle de pragas, sendo utilizados como fontes de agentes bioativos (JIANG et al., 2013). Radzio e Kück (1997) citam *A. niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* e *P. chrysogenum* como exemplos de fungos filamentosos utilizados em indústrias, os quais são “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (*GRAS – Generally Recognized as Safe*) pelo *FDA (Food and Drug Administration)*.

2.1.1 *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* (*Eurotiomycetes*, *Ascomycota*) é diverso, com alto impacto econômico e social. Suas espécies estão amplamente distribuídas no mundo, (SAMSON et al., 2014; SLOOTHAAK et al., 2016), principalmente no solo (KANG et al., 2013). Membros deste gênero são espécies-modelo, estudados para entender os processos de desenvolvimento em fungos, por vários motivos: são facilmente cultiváveis em condições laboratoriais, sua morfologia é bem caracterizada quanto ao desenvolvimento de esporos assexuados e exibem sistemas de reprodução sexual homotáticos (auto-férteis) e heterotáticos (OJEDA-LOPEZ et al., 2018). Estima-se que

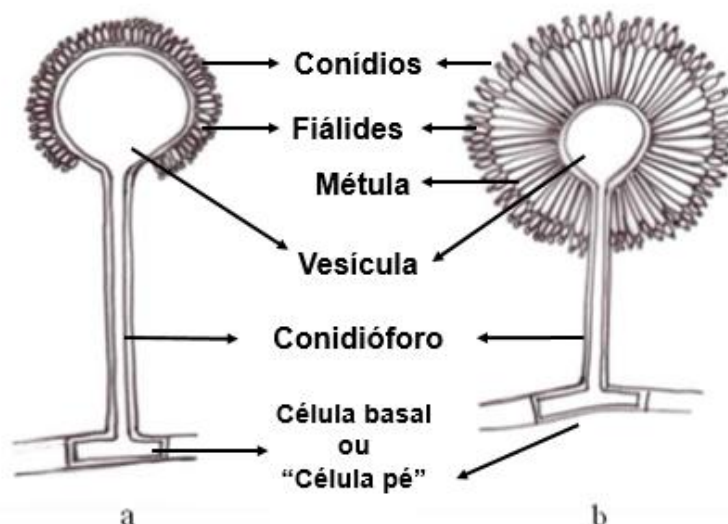
mais de 250 espécies de *Aspergillus* foram catalogadas (SIMÕES et al., 2013; SILVA et al., 2015).

Os fungos deste gênero reproduzem-se assexuadamente (produz esporos assexuais), porém algumas espécies apresentam a forma sexuada, caracterizada pela presença de cleistotécios, ascos e ascósporos; neste caso, o fungo é classificado como teleomorfo. A taxonomia do gênero baseia-se nos caracteres morfológicos e fisiológicos, bem como nas características reprodutivas observadas. Microscopicamente, apresentam sistema somático formado por hifas regularmente septadas de aproximadamente 4 μ m de diâmetro. O gênero caracteriza-se por apresentar a base do conidióforo em forma de “T” ou “L”. É esta base que promove a conexão do conidióforo à hifa somática, sendo comumente denominada de “célula pé”. O conidióforo, simples e usualmente asseptado, é o ramo que se desenvolve a partir da “célula pé”, podendo apresentar diferentes comprimentos. No seu ápice, forma-se a vesícula, a qual pode possuir diferentes formas e tamanho, dependendo da espécie. Formadas diretamente na vesícula, as fiálides dão origem aos conídios. Em algumas espécies, o conídio fica diretamente ligado às fiálides; essa característica pertence às espécies denominadas de unisseriadas. Outras espécies possuem métulas, que são estruturas localizadas entre a vesícula e as fiálides; a presença destas estruturas caracteriza estas espécies como bisseriadas. A coloração das colônias é a característica principal macroscópica para a diferenciação das Seções de *Aspergillus*. Eles possuem vários tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza (KLICH e PITT, 1988; KLICH, 2002; XAVIER et al., 2008). As Figuras 2a e 2b ilustram os dois tipos de conidióforos citados.

Espécies deste gênero são conhecidas por deteriorar alimentos e produzir micotoxinas, as quais são metabólitos secundários naturalmente produzidos por fungos como os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (IQBAL et al., 2016). As aflotoxinas, por exemplo, podem ser produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus* (ALBERTI et al., 2017; DASAN et al., 2017; DENG et al., 2017), a ocratoxina A por *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. ochraceus* (LAHOUAR et al., 2017) e a fumonisina B₂ por *A. welwitschiae* e *A. niger* (MASSI et al., 2016). A aflatoxina B₁ é carcinogênica e, dentre os três grupos citados, é a mais tóxica (IQBAL et al., 2016; DASAN et al., 2017; LIPPOLIS et al., 2017). A ocratoxina A é nefrotóxica, potencialmente carcinogênica, teratogênica e pode ser encontrada em uma variedade de produtos alimentícios, como cereais, grãos, frutas diversas e especiarias. A

fumonisina B₂ é frequentemente encontrada em cereais e pode causar uma variedade de efeitos tóxicos em diferentes espécies animais, tendo sido associada com o câncer esofágico em seres humanos (MASSI et al., 2016; LIPPOLIS et al., 2017).

Figura 2- (a) Conidióforo unisseriado de *Aspergillus*; (b) Conidióforo bisseriado de *Aspergillus*.



Fonte: Adaptado de Klich (2002)

Aspergillus spp. também são frequentemente relatadas como patógenos de plantas e animais. Em humanos, o espectro da doença varia de acordo com alguns aspectos, como a colonização e as condições alérgicas (MEIS et al., 2016). A aspergilose invasiva é relacionada com um grande número de mortes de causa infecciosa em pacientes imunocomprometidos. Embora a maioria dos casos seja causada por *A. fumigatus*, outras espécies podem desenvolver este agravo (PARK et al., 2016), como *A. flavus*, que é bem conhecido por causar doenças respiratórias induzida pela inalação dos conídios (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018).

Apesar destes aspectos aqui citados, *Aspergillus* é um dos gêneros fúngicos com maior importância econômica em biotecnologia (KOCSUBÉ et al., 2016). Fungos deste gênero são utilizados para a produção de vários metabólitos com aplicações industriais, como ácidos orgânicos, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e enzimas, ou ainda como agentes em fermentações de alimentos. A variedade de metabólitos produzida por espécies deste gênero pode estar relacionada à sua grande diversidade (SAMSON et al., 2014; YANG et al., 2016).

2.1.2 *Paecilomyces*

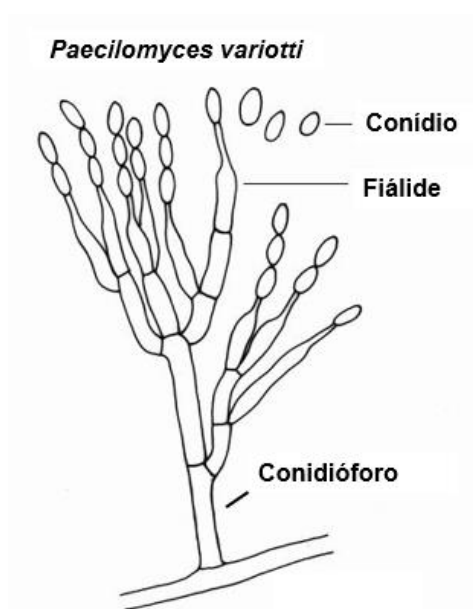
As espécies de *Paecilomyces* são comumente encontradas em amostras de solo, nos produtos alimentares e em cosméticos. Algumas espécies deste gênero podem causar deterioração alimentar, além de várias doenças em humanos, incluindo sinusite, infecções de feridas, osteomielite, otite e peritonite (YANG et al., 2016). As espécies mais comumente associadas a infecções são: *P. lilacinus*, *P. variotii* e *P. marquandii* (CHEN e CHEN, 2016).

Contudo, algumas espécies são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários de diferentes classes químicas e com atividades biológicas variadas, como agentes citotóxicos, antibacterianos e imunoestimulantes (TELES; TAKAHASHI, 2013). Há relatos constatando que *P. lilacinus* tem sido amplamente testado, pois produz substâncias que atuam como agentes de biocontrole de nematoides em plantas (VIGUERAS et al., 2014; YANG et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Ademais, Teles e Takahashi (2013) constataram que esta espécie produz um composto inibidor da acetilcolinesterase e, portanto, pode representar um forte aliado no tratamento da Doença de Alzheimer. *P. militaris* é produtor de Militarina A, um alcaloide que possui atividade neurogênica. *P. thermophila*, como seu próprio nome sugere, é um fungo termófilo produtor de enzimas lignocelulolíticas, como a β -glicosidase (YANG et al., 2013), bem como de xilanases e quitinases (KOPPARAPU et al., 2012). Já *P. variotii* é produtor das enzimas α -amilase (MICHELIN et al., 2010), fitase e tanase (MADEIRA et al., 2011).

Paecilomyces pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae* (TELES e TAKAHASHI, 2013). É morfologicamente similar a representantes de *Penicillium*. O gênero foi revisto por Samson, em 1974, que reconheceu e definiu 31 espécies e dividiu o gênero em duas seções: *Paecilomyces* seção *Paecilomyces*, a qual contém principalmente membros termófilos e *Paecilomyces* seção *Isarioidea*, a qual é composta por mesófilos, incluindo várias espécies entomopatogênicas ou nematófagas bem conhecidas, tais como *P. amoeneroseus*, *P. farinosus*, *P. fumosoroseus*, *P. javanicus*, *P. lilacinus*, e *P. tenuipes* (SAMSON, 1974; INGLIS; TIGANO, 2006). Samson (1974) também afirma que *P. variotii* e *P. lilacinus* são as espécies mais comumente encontradas em habitats como solo e estruturas marinhas, como esponjas.

Espécies de *Paecilomyces* apresentam conidióforos simples ou agrupados, arranjados em ramos verticilados ou irregulares, comportando as fiálides. Estas, por sua vez, possuem uma porção basal cilíndrica ou elipsoide, que termina em um longo pescoço cilíndrico. Os conídios podem ser elipsoides a fusoides, unicelulares, hialinos ou pigmentados. A Figura 3 representa esquematicamente estas características citadas, utilizando *P. variotii* como exemplo. Dependendo da espécie e do meio de cultivo, as colônias podem apresentar colorações brancas, amarelas, rosas ou vermelhas (SAMSON, 1974; ALVES, 1998).

Figura 3 - Representação esquemática do conidióforo do fungo *P. variotii*



Fonte: Adaptado do site <<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/pae.htm>> (Acesso em 24/01/2017)

2.1.3 Metabólitos secundários produzidos por fungos

Os metabólitos primários são compostos que exercem papéis fundamentais na sobrevivência das espécies. Como exemplo, desempenham funções ativas na fotossíntese e na respiração (AGOSTINI-COSTA et al., 2012) e incluem carboidratos, lipídeos, ácidos orgânicos, entre outros (AHMED et al., 2017). Em contrapartida, os metabólitos secundários geralmente não estão associados com o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo, mas são conhecidos por

desempenhar um papel vital nos sistemas de defesa dos mesmos (DIKSHIT; TALLAPRAGADA, 2018).

Geralmente, os metabólitos secundários possuem baixo peso molecular, porém suas estruturas químicas são complexas (YOGABAANU et al., 2017). Constituem um grupo extremamente diversificado de produtos naturais, os quais são sintetizados por plantas, fungos, bactérias, algas e animais. A maioria dos metabólitos secundários, como terpenos, compostos fenólicos e alcaloides são classificados com base na sua origem biossintética (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Embora seu papel ecológico ainda não tenha sido totalmente elucidado, muitos metabólitos secundários exercem atividades que, provavelmente, fornecem ao organismo produtor uma vantagem competitiva, facilitando a sobrevivência em seu ambiente natural (YOGABAANU et al., 2017). Por exemplo, as toxinas auxiliam na competição nos ambientes, auxiliando na proteção contra outros micro-organismos ou insetos; as melaninas podem auxiliar na proteção contra o estresse abiótico; dentre outros (THROCKMORTON et al., 2016; ULAGANATHAN et al., 2017; WANG et al., 2018). Portanto, a ausência destes compostos não resulta em morte imediata dos organismos, porém representa um comprometimento a longo prazo da sua capacidade de sobrevivência (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

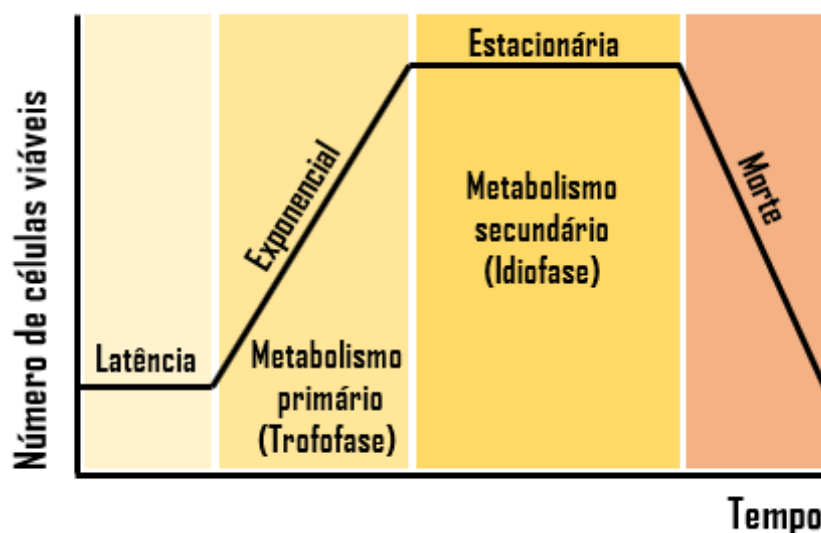
Os metabólitos secundários são produzidos por micro-organismos, especialmente por alguns grupos selecionados de actinomicetos e fungos filamentosos (DIKSHIT; TALLAPRAGADA, 2018). Segundo Khan et al. (2014), a química dos fungos é um pouco mais complexa, pois são estruturalmente diferentes das plantas e dos animais, apesar de compartilhar alguns padrões semelhantes com tais espécies. Por exemplo, seguem as mesmas vias biossintéticas para a síntese de metabólitos secundários, como terpenos e policetídeos.

Para estimular a produção de metabólitos secundários a partir de fonte microbianas em geral, as condições de cultivo são exploradas para avaliar seus efeitos sobre o rendimento do produto que se deseja obter. Um parâmetro avaliado é a composição do meio de cultivo, pois o tipo e a natureza do carbono (C) e do nitrogênio (N) fornecidos, bem como a relação C/N, têm um efeito dominante, pois estão diretamente associados ao crescimento da biomassa de um organismo e ao rendimento de metabólitos selecionados (DIKSHIT e TALLAPRAGADA, 2018). Assim, pequenas alterações nutricionais e/ou ambientais podem influir diretamente na

quantidade, qualidade e diversidade dos metabólitos secundários como produtos de fermentação (KHAN et al., 2014).

Geralmente, os metabólitos secundários são produzidos próximo ao final da fase de crescimento ativo, em uma etapa do ciclo de crescimento conhecida como idiofase. São sintetizados a partir de compostos que são derivados de vias metabólicas primárias, as quais ocorrem na trofofase, em condições controladas de nutrientes (NIGAM; SINGH, 2014; YOGABAANU et al., 2017). A Figura 4 ilustra uma curva de crescimento microbiano, mostrando as 4 fases típicas, enfatizando a trofofase e a idiofase.

Figura 4 - Fases do crescimento microbiano



Fonte: O autor

Diferentes classes destes compostos são frequentemente associadas a um conjunto restrito de espécies dentro de um grupo filogenético, constituindo compostos bioativos (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Os metabólitos secundários de origem fúngica são, geralmente, classificados em uma das seguintes categorias, baseando-se na sua origem biossintética: policetídeos, peptídeos não-ribossomais, terpenoides, derivados de triptofano prenilados ou compostos híbridos, tais como híbridos de policetídeos/peptídeos não-ribossomais que incorporam componentes de várias vias (HILLMAN et al., 2017).

No geral, os metabólitos secundários microbianos são amplamente explorados, relacionando-os às suas atividades biológicas com fins biotecnológicos: são usados

como antibióticos e outros medicamentos, toxinas, pesticidas e fatores de crescimento de animais e plantas (NIELSEN e NIELSEN, 2017). Hillman et al. (2017) afirmam que os metabólitos secundários de fungos são frequentemente bioativos e quimicamente diversos devido ao seu papel em conferir uma vantagem seletiva ao fungo produtor em ambientes competitivos pois, de acordo com Souza et al. (2017), os fungos representam uma parte dos ecossistemas naturais, podendo ser fontes promissoras para a produção de vários compostos e formando uma parcela cada vez mais importante para os setores farmacêutico, agrícola e industrial. Ademais, o sucesso dos fungos filamentosos para a produção industrial de produtos biotecnológicos deve-se em grande parte à versatilidade metabólica destes micro-organismos (PIMENTA et al., 2010; LOPES et al., 2013).

Muitos fármacos disponíveis no mercado, como antitumorais, imunossupressores, agentes antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, hipocolesterolêmicos e anti-inflamatórios foram obtidos a partir do metabolismo fúngico (TELES e TAKAHASHI, 2012). Este fato reforça a importância dos fungos filamentosos como produtores de compostos bioativos de alto valor para a indústria farmacêutica. As tecnologias em evolução e a crescente acessibilidade do sequenciamento estão aumentando rapidamente o conhecimento por meio da aquisição de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos. Análises de bioinformática mostraram que os fungos filamentosos são capazes de produzir metabólitos bioativos incalculáveis, mas numerosos aglomerados gênicos que codificam compostos potencialmente úteis frequentemente permanecem transcricionalmente silenciosos sob condições de laboratório. Portanto, é indispensável desenvolver métodos de alto rendimento, versáteis e precisos para explorar as capacidades metabólicas completas dos fungos filamentosos para a descoberta de novas drogas e prevenção de patógenos (DENG et al., 2017).

Gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium* e *Fusarium*, todos isolados típicos do solo, são conhecidos por sua capacidade de sintetizar diversas estruturas químicas (OSAMWONYI e WAKIL, 2012). Destes, grande número de extratos fúngicos e/ou produtos extracelulares foram obtidos a partir de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, destacando-se os produtos que possuem atividade antimicrobiana (LOPES et al., 2013).

Embora o estudo sistemático dos metabólitos secundários fúngicos tenha começado em 1922, foi com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em

1928, que a exploração de metabólitos secundários começou a se intensificar (YOGABAANU et al., 2017), fazendo com que os fungos filamentosos fossem utilizados como produtores de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana, imunossupressora e hipolipemiante (LOPES et al., 2013). Ademais, os fungos filamentosos estão envolvidos na produção de outros metabólitos, incluindo ácidos orgânicos, enzimas, exopolissacarídeos e biofilmes para usos industriais (JIANG et al., 2013). Estatinas utilizadas na redução do colesterol, griseofulvina antifúngica e ácido micofenólico como imunossupressor são exemplos de outros metabólitos secundários de fungos que atingiram com sucesso o mercado farmacêutico (NIELSEN e NIELSEN, 2017).

Vários processos industriais empregando isolados de *Aspergillus* para a produção de ácidos orgânicos foram desenvolvidos (por exemplo, ácido cítrico, ácido glucônico e ácido kójico), os quais possuem um *status* importante na produção biotecnológica de produtos químicos. Por exemplo, *A. niger* produz ácido cítrico, enquanto *A. terreus* é capaz de produzir ácido itacônico. Os ácidos orgânicos são utilizados como aditivos alimentares, acidulantes, na nanomedicina, em indústrias químicas, entre outros (YANG et al., 2016).

Os metabólitos secundários de *Aspergillus* também são reconhecidos por suas aplicações na indústria farmacêutica. Segundo Haynes et al. (2012), a asperlicina, empregada no tratamento de distúrbios neurológicos, é produzida por *A. alliaceus*. *A. nidulans* produz a equinocandina B, um hexapeptídeo conjugado com ácidos graxos que possui forte atividade antifúngica e cujos derivados semi-sintéticos são utilizados no tratamento de micoses invasivas (HUTTEL et al., 2016). (Kang et al. (2013) concluíram que *A. fumigatus* também possui potencial antifúngico. Wang et al. (2014) destacaram a atividade anticâncer do metabólito aspergiolide A, produzido por *A. glaucus*.

A habilidade que os fungos filamentosos possuem de crescer em substratos simples e baratos e a sua capacidade de produzir uma vasta gama de metabólitos comercialmente interessantes torna-os atraentes para explorá-los como organismos de produção em biotecnologia (MEYER, 2008). Alguns exemplos de compostos importantes produzidos industrialmente e que são obtidos a partir de fungos filamentosos são citados a seguir, no Quadro 1. Na Figura 5, são ilustradas as estruturas químicas de alguns metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos.

Quadro 1 - Exemplos de compostos industrialmente importantes produzidos por fungos filamentosos

Compostos	Micro-organismo	Principais áreas de aplicação
Ácidos		
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria de alimentos e bebidas
Ácido itacônico	<i>A. terreus</i>	Indústria de polímeros
Ácido kójico	<i>A. oryzae</i>	Indústria de alimentos
Enzimas		
α-amilase	<i>A. niger</i> e <i>A. oryzae</i>	Processamento do amido e indústria de alimentos
Celobiohidrolase e Celulase	<i>Trichoderma viride</i> e <i>T. reesei</i>	Indústria têxtil, de celulose de e papel
Fitase	<i>A. niger</i> e <i>A. oryzae</i>	Indústria de alimentos
Glicoamilase	<i>A. phoenicis</i> e <i>Rhizopus delemar</i>	Indústria de processamento do amido
Glicose oxidase	<i>A. niger</i> e <i>A. oryzae</i>	Indústria têxtil e biossensor
Lacase	<i>A. fumigatus</i>	Indústria têxtil, de celulose de e papel
Lipases	<i>A. niger</i> e <i>A. oryzae</i>	Indústria de alimentos e de detergentes
Pectina liase	<i>T. reesei</i>	Indústria de alimentos
Proteases	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> e <i>R. delemar</i>	Indústria de alimentos e de detergentes
Quimosina	<i>A. niger</i> e <i>Mucor miehei</i>	Indústria de alimentos
Xilanase	<i>T. reesei</i> , <i>T. konignii</i> e <i>A. niger</i>	Padarias, indústria têxtil, de celulose e de papel
Exopolissacarídeos		
Escleroglicano	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Produção de petróleo e indústria de cosméticos
Pululano	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Indústria farmacêutica e de alimentos
Metabólitos secundários		

Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Indústria farmacêutica
Ciclosporina	<i>Tolypocladium nivenum</i>	Indústria farmacêutica
Ergotamina	<i>Claviceps purpurea</i>	Indústria farmacêutica
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Indústria farmacêutica
Lovastatina	<i>Monascus ruber</i> e <i>A. terreus</i>	Indústria farmacêutica
Penicilina	<i>P. chrysogenum</i>	Indústria farmacêutica
Taxol	<i>Taxomyces andrenae</i>	Indústria farmacêutica
Zeranol	<i>Fusarium graminearum</i>	Anabolizante utilizado na criação de gado
Outros		
Ácidos graxos poli-insaturados	<i>Mucor circinelloides</i>	Indústria farmacêutica, de alimentos e rações
Ácido pantotênico	<i>F. oxysporum</i>	Indústria farmacêutica, de alimentos e rações
Hidrofobina	<i>T. reesei</i>	Engenharia de tecidos e nanotecnologia
Biomassa	<i>F. venentatum</i>	Indústria de alimentos

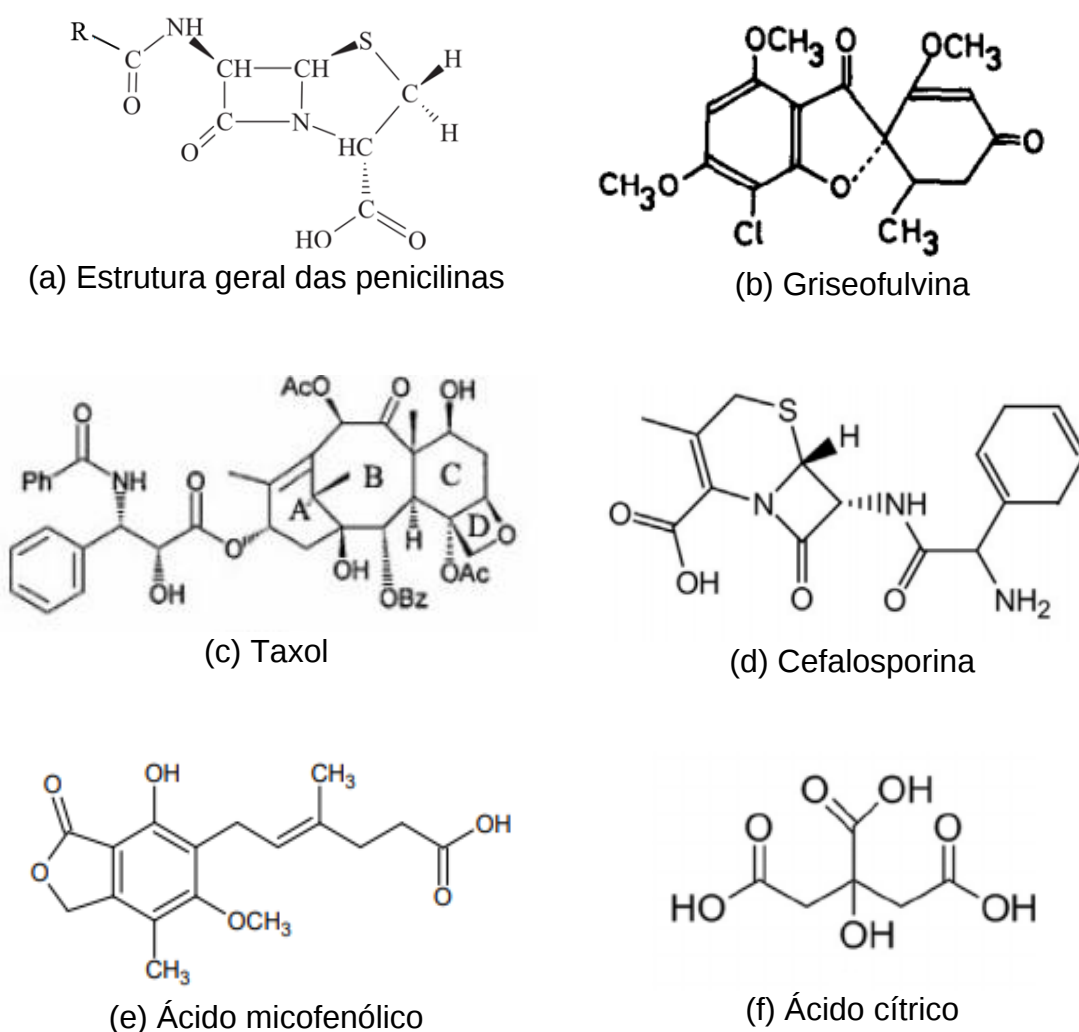
Fonte: Adaptado de Meyer (2008)

2.1.3.1 Metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus (Trichocomaceae) é um ascomiceto filamentoso de importância biotecnológica e médica (WANG et al., 2018). É a espécie mais importante da seção *Terrei*, reconhecida por ser ubíqua, estando presente em diversos locais do meio ambiente: solos do deserto e de pastagens, além de montes de compostagem; também são encontrados contaminando produtos vegetais como milho, cevada e amendoim (SAMSON et al., 2011). Vários estudos foram realizados

utilizando isolados de *A. terreus* oriundos do ambiente marinho (SUN et al., 2018; WU et al., 2018; YANG et al., 2018).

Figura 5 - Fórmulas estruturais de metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos



Fontes: (a) Calixto; Cavalheiro, 2012; (b) Fujita et al., 1993; (c) GUO et al., 2006; Refat et al., 2017; (e) Costa, 2009; (f) Lu et al., 2019

Esta espécie emergiu como um fungo importante para a indústria farmacêutica devido à sua capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários (RAINA et al., 2012). Segundo Boruta e Bizukoje (2014), há uma lista de metabólitos associados com espécies de *Aspergillus* disponíveis online (<https://www.aspergillus.org.uk>), o qual destaca *A. terreus* como uma espécie associada a um grande número de moléculas.

Aspergillus terreus é reconhecido como produtor de diversas classes de metabólitos secundários, dentre elas alcaloides, terpenoides, policetídeos, butenolídeos e xantonas (LIU et al., 2017; SUN et al., 2018), os quais desempenham uma vasta gama de atividades biológicas. Contudo, destaca-se a produção de lovastatina, que é um potente fármaco utilizado para baixar o colesterol sanguíneo (BIZUKOJC et al., 2012) e foi a primeira estatina a ser aceita pelo FDA em 1987. De acordo com Jahromi et al. (2012), lovastatina também pode ser produzida por outros micro-organismos, como espécies de *Penicillium*, *Monascus*, *Hypomyces*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Gymnoascus*, e *Trichoderma*, mas apenas a lovastatina produzida por *A. terreus* é comercializada. Outros metabólitos secundários produzidos por *A. terreus*, assim como suas respectivas atividades biológicas, estão listados a seguir, no Quadro 2. A Figura 6 ilustra as estruturas químicas de alguns metabólitos secundários produzidos por *A. terreus*.

Quadro 2 - Metabólitos secundários isolados a partir de cultivos de diferentes linhagens de *Aspergillus terreus*, isoladas de locais distintos

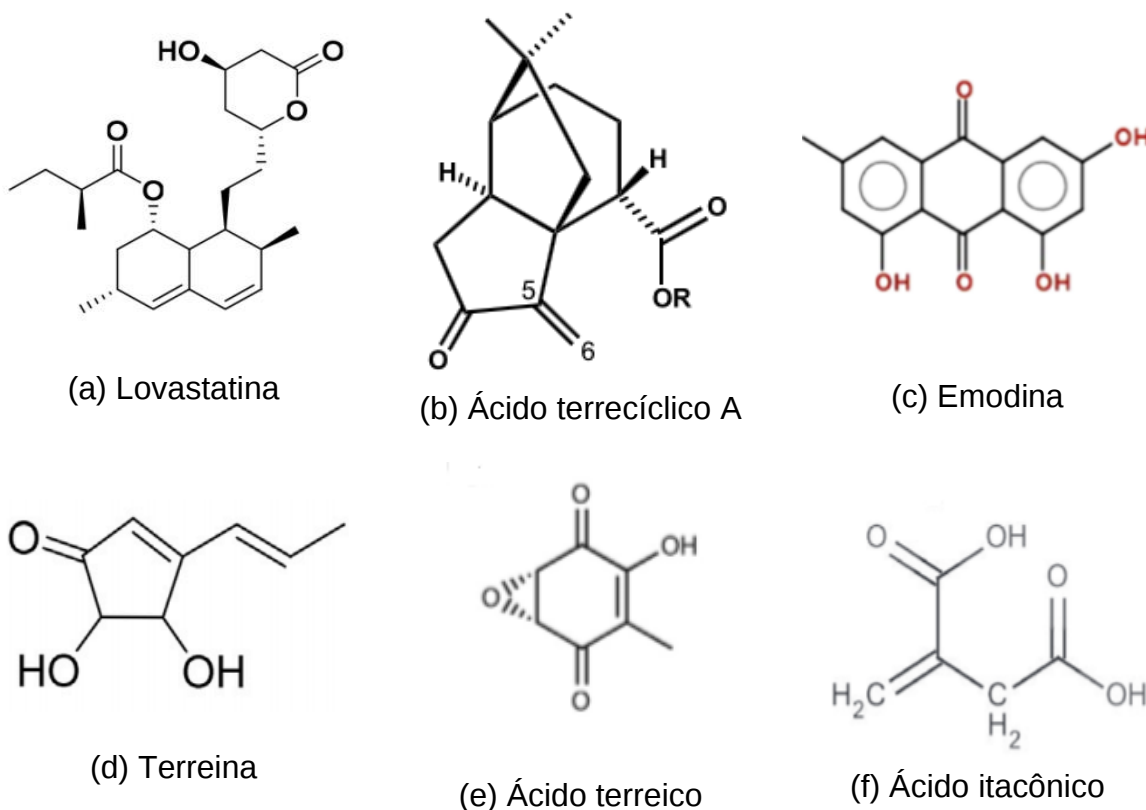
Atividade biológica	Referência	Composto	Substrato de isolamento
Antidiabética	Dewi et al., 2015	Butirolactonas	Solo
Anti-inflamatória	Liu et al., 2017	Terpenoides	Endofítico/mangue
	Liu et al., 2018	Butenolídeos	Corais
Antileishmanicida	Elkhayata et al., 2015	Terrenolide S	Endofítico
Antimicrobiana	Hirota et al., 1983	Ácido terrecíclico A	Não informado
	Dewi et al., 2008	Emodina	Não informado
	Wang et al., 2011	Butirolactonas	Mar
	Barakat e Gohar, 2012	Extrato bruto	Mar
	Ibrahim et al., 2015	Aspernolides Fe G	Endofítico
Antioxidante	Wang et al., 2013	Polissacarídeos	Solo

Antioxidante	Trabolsy et al., 2014	Terreina	Não informado
	Dewiet al., 2015	Isoaspulvinone E e Aspulvinone E	Coleção de culturas
	Sun et al., 2018	Butenolídeos	Mar
Antitumoral	Turbyville et al., 2005	Ácido terrecíclico A	Rizosfera/deserto
	Li et al., 2016	AP2A (polissacarídeo)	Solo
	El-Sayed et al., 2018	Taxol	Endofítico
	Qi et al., 2018	Butenolídeos	Mar
Antiviral	Gao et al., 2013	Aspuvinonas	Rizosfera/mangue
	Wang et al., 2011	Butirolactonas	Mar
Citotóxica	Li et al., 2015	Fumigaclavine I	Endofítico
	Guo et al., 2016	Butenolídeos	Endofítico
Hipocolesterolêmica	Kamath et al., 2015	Lovastatina	Solo
Lipolítica	Parmar et al., 1997	Lipase	Solo

2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A identificação e a classificação adequadas dos fungos são aspectos de suma importância para diversas áreas, como a Microbiologia e a Biotecnologia. Bugni e Ireland (2004) enfatizam que estes aspectos são fundamentais para o estudo de produtos naturais, por exemplo. Sem identificação adequada, as investigações químicas dos fungos tornam-se difíceis, senão impossíveis de reproduzir. Além disso, tal caracterização, combinada com os aspectos químicos, pode fornecer ferramentas adicionais para os micologistas classificarem os fungos.

Figura 6 - Fórmulas estruturais de metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus terreus*



Fontes: (a) Tavares et al., 2016; (b) Turbyville, 2005; (c) Hsu; Chung, 2012; (d) Zaehle et al., 2014; (e) Boruta e Bizukojc (2014); (f) Steiger et al., 2013

Tradicionalmente, a taxonomia baseia-se em observações de características macroscópicas da colônia e microscópicas de estruturas fúngicas. A análise da colônia visa observar características peculiares, como cor, textura, superfície e pigmento difundido no meio de cultura. A observação das estruturas microscópicas, como as hifas (hialina ou demácia; apocítica ou cenocítica) e os esporos (forma, disposição, formação etc) são de suma importância para a identificação de fungos filamentosos. Para tanto, a morfologia microscópica pode ser visualizada utilizando a técnica de microcultivo, que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos (ANVISA, 2004). Porém, quando não houver produção de estruturas reprodutivas, pode-se alterar as condições de cultivo. Para induzir a esporulação, pode ser utilizado meio de cultura seletivo, aumentar a incidência de luz sobre a cultura, irradiação com doses reduzidas de luz

ultravioleta. As estruturas observadas devem ser comparadas com as literaturas de referência, através de chaves de identificação.

Embora os fungos tenham sido historicamente identificados e classificados por características morfológicas, os micologistas têm utilizado uma série de técnicas para ajudar a identificar fungos e organizar sua sistemática (BUGNI e IRELAND, 2004). Isto acontece porque a identificação fenotípica possui algumas limitações, como: recursos humanos experientes para observação de caracteres morfológicos; as estruturas esporulantes devem estar presentes, o que requer tempo para crescimento e interpretação; é um método laborioso e demorado; por vezes, os isolados são morfológicamente semelhantes, mas pertencem a espécies diferentes (LAU et al., 2013; STÜBIGER et al., 2016).

Assim, a morfologia ainda desempenha um papel importante na taxonomia, mas o uso adicional de outras técnicas está se tornando mais comum (ANVISA, 2004; BUGNI e IRELAND, 2004). Diversos pesquisadores têm relatado a importância de uma abordagem polifásica, ou seja, a combinação de diferentes ferramentas de identificação, como características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Por exemplo, Zulkifli e Zakaria (2017) afirmam que a identificação precisa de espécies de *Aspergillus* ao nível de espécies envolve tanto os caracteres morfológicos como os moleculares. Dependendo da espécie, a morfologia pode não ser suficiente, pois características microscópicas e macroscópicas de algumas espécies são semelhantes, como acontece com os *Aspergillus* Seção *Nigri*.

A identificação de espécies microbianas tem sido amplamente realizada utilizando técnicas moleculares modernas, as quais são rápidas, específicas e sensíveis (AL-HINDI et al., 2017). Métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), são utilizados nos estudos de identificação. O seu uso representa um avanço importante nos estudos de organismos minuciosos, muitas vezes incultiváveis. Alguns problemas, como a escassez de caracteres morfológicos (o que acontece, por exemplo, com leveduras), caracteres não correspondentes entre os táxons (por exemplo, estágios assexuais e sexuais) e morfologias convergentes não interferem na utilização desta técnica (BLACKWELL, 2011), representando, portanto, uma vantagem para a sua utilização.

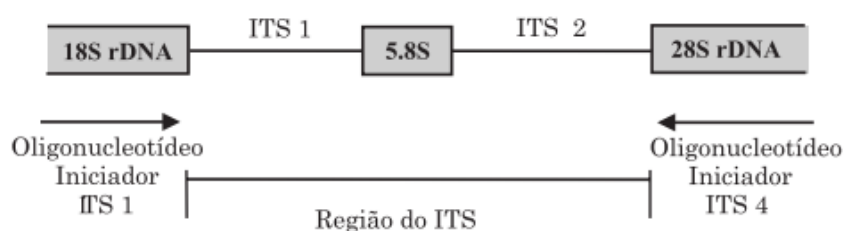
A PCR é uma técnica baseada na amplificação de uma região específica do DNA, delimitada pela sequência dos oligonucleotídeos iniciadores. Esta reação ocorre em três etapas: (1) fase de desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura,

geralmente em temperaturas de 94 °C a 96 °C; (2) fase de anelamento, na qual o par de oligonucleotídeos iniciadores se liga à sequência complementar na fita de DNA; (3) fase de extensão da fita de DNA (CHEN; JANES, 2002). Os ciclos de temperatura permitem a desnaturação da dupla-hélice do DNA, a ligação dos *primers* e extensão da fita pela enzima *Taq* DNA polimerase.

As sequências da região ITS (*Internal Transcribed Spacer* – Espaçadores Internos Transcritos) e da β -tubulina são muito usadas para identificação molecular de fungos. A região ITS é usada para identificação inicial de *Aspergillus*. A β -tubulina é comumente utilizada como marcador secundário de identificação desta espécie, sendo usada principalmente para fins confirmatórios em análises filogenéticas (ZULKIFI e ZAKARIA 2017).

A amplificação da região ITS foi escolhida como um “marcador universal de código de barras de DNA para fungos”, sendo considerada o padrão para a identificação dos mesmos (LECELLIER et al., 2014). Tal região está localizada entre os genes 18S e 28S do rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos. O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S. Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros, pois é altamente conservado na espécie, mas é variável entre espécies (LUPATINI et al., 2008; MENEZES et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2014). A Figura 7 traz uma representação esquemática da região do rDNA, com os espaços internos transcritos (ITS1 e ITS2) e a localização dos iniciadores para a amplificação desta região.

Figura 7 - Região do rDNA com localização dos iniciadores para a amplificação de ITS1 e ITS2.



A ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) é comumente utilizado para atribuir taxonomicamente leituras de sequências individuais usando um banco de dados com sequências de ITS já nomeadas (YAMAMOTO et al., 2014).

Desde a descrição da técnica de PCR, modificações foram desenvolvidas para atender outras necessidades e aplicações específicas. Sousa et al. (2015) enfatizam que métodos que empregam a PCR estão entre as alternativas mais promissoras na identificação de micro-organismos, sendo cada vez mais aplicados para este fim.

Uma das variações da técnica de PCR é a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição. É uma técnica baseada no corte de um fragmento de DNA por enzimas de restrição, as quais reconhecem sequências específicas do DNA e clivam a fita em fragmentos mais curtos e de tamanhos diferentes. Com isso, perfis de restrição são gerados (TOLBA et al., 2013). Os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose.

Dentre as aplicações desta técnica, a RFLP-PCR tem sido utilizada por vários pesquisadores para detectar a variação intraespecífica em um gênero, pois os organismos podem ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. Se dois organismos diferirem na distância entre os sítios de clivagem de uma enzima de restrição, o comprimento dos fragmentos produzidos vai diferir quando o DNA for digerido com uma enzima. Logo, os perfis gerados para cada cepa/espécie serão distintos (GLEN et al., 2001). Logo, a presença de diferentes fragmentos de restrição pode servir como um *fingerprint* genético de uma determinada espécie (BALINI, 2015).

2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Desde a década de 1940, os agentes antimicrobianos reduzem significativamente os óbitos causados por doenças infecciosas. Estas substâncias foram utilizadas para o tratamento de inúmeras infecções, as quais foram a principal causa de morte na época. Desde então, o uso das mesmas tem sido benéfico e, quando prescritas e administradas corretamente, seu valor na cura do paciente é enorme (PAPHITOU, 2013; SAHA et al., 2014).

No entanto, estas drogas têm sido utilizadas tão amplamente que os micro-organismos passaram a desenvolver mecanismos de adaptação, tornando os medicamentos menos eficazes. Alguns micro-organismos podem desenvolver

resistência a um ou a vários agentes antimicrobianos (ou classes relacionadas). Estes últimos são frequentemente referidos como cepas multirresistentes a fármacos (MDR). As infecções causadas pelas MDR são difíceis de tratar e podem levar a um aumento da morbidade e mortalidade (DIJKSHOORN et al., 2007; SAHA et al., 2014).

O desenvolvimento da resistência geralmente é consequência do mau uso de antibióticos, que exerce pressão seletiva indevida sobre micro-organismos, combinado com práticas ineficazes de controle de infecção que aceleram a sua propagação (PAPHITOU, 2013). Os mecanismos de desenvolvimento da resistência podem variar de patógeno para patógeno. Por exemplo, as bactérias são seres com alta capacidade de adaptação a diversos fatores; multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. Nelas, a resistência aos antibióticos pode ser causada por alguns fatores básicos: inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa por alterações químicas, geralmente promovidas por enzimas bacterianas; modificação do alvo, que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana, que promovem redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química; transmissão do alvo, visto que algumas bactérias se tornam insensíveis a alguns antibióticos porque são capazes de transmitir a inativação de uma determinada enzima (GUIMARÃES et al., 2010). Ademais, as bactérias podem utilizar mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos.

Em alguns casos, os micro-organismos tornaram-se tão resistentes que nenhum antibiótico disponível é eficaz contra eles. No ambiente hospitalar, a erradicação dos micro-organismos multidrogas resistentes (MDR) pode exigir medidas específicas, como o isolamento dos pacientes e fechamento temporário de alas. Ademais, o crescente número de cepas resistentes à terapia disponível aumenta o tempo de internação e exige medicamentos de alto custo que, por vezes, são de difícil acesso. A presença desses organismos, portanto, representa um fardo médico e organizacional para os serviços de saúde. Logo, este fato fez com que a resistência antimicrobiana fosse listada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos problemas mais importantes na saúde pública global. (DIJKSHOORN et al., 2007; LESKI et al., 2013; KIZIS et al., 2014; KIZIS et al., 2017).

Como alternativa para esta problemática, os profissionais de saúde foram forçados a retomar o uso de agentes mais velhos. Antimicrobianos que estavam em

desuso estão sendo utilizados para tratar bactérias MDR porque, em alguns casos, representam as únicas opções disponíveis que têm efeito positivo. Porém, frequentemente, estes medicamentos possuem características farmacocinéticas e de toxicidade que limitam a sua eficácia clínica (KAYE et al., 2017).

Assim, sabendo que qualquer pessoa pode ser afetada (tanto pacientes hospitalizados como pessoas da comunidade estão em risco de infectar-se por patógenos multirresistentes), algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos: caracterização dos genes responsáveis pela resistência; prevenção de infecções com o uso de vacinas; uso racional de antibióticos; estabelecimento de sistemas de vigilância eficazes na detecção precoce, controle e prevenção da disseminação de micro-organismos resistentes; medidas educativas para sensibilizar as pessoas quanto ao uso inadequado de antibióticos; descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (GUIMARÃES et al., 2010; PAPHITOU, 2013).

Vários autores defendem o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos como alternativa para solucionar a problemática da múltipla resistência (GUIMARÃES et al., 2010; PAPHITOU, 2013; BRACARENSE e TAKAHASHI, 2014; SAHA et al., 2014; MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2016; KAYE et al., 2017), bem como para suprir a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes dos fármacos em uso, que sejam mais eficazes e apresentem menos efeitos adversos.

Produtos naturais são uma fonte prolífica de descoberta de drogas. Fontes naturais, especialmente plantas e micro-organismos, têm sido exploradas a fim de encontrar novos agentes antimicrobianos. Ao longo dos últimos 30 anos, uma grande fração de drogas anticancerígenas e anti-infecciosas veio de produtos naturais ou derivados de produtos naturais (REN et al., 2017). Guimarães et al. (2010) afirmam que a ampla biodiversidade existente no mundo é uma grande aliada na descoberta de novos compostos com este potencial. Os mesmos autores acrescentam que antibióticos de origem natural geralmente apresentam estruturas químicas complexas, as quais são importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em micro-organismos patogênicos. Nos últimos anos, os pesquisadores têm voltado atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas estão frequentemente associados à nova diversidade química. Uma ampla diversidade de organismos tem sido explorada nos mais diversos habitats, especialmente em locais de condições ambientais extremas.

Desde a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, os fungos filamentosos têm sido uma importante fonte de novos medicamentos para utilização terapêutica (LAGUNA et al., 2015). Sabe-se que a produção de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano por fungos ocorre de maneira natural, uma vez que a sua sobrevivência nos habitats naturais depende da sua eficiência em barrar o crescimento de outros micro-organismos co-habitantes (BRACARENSE e TAKAHASHI, 2014). Alternativamente, quando tais metabólitos não podem ser usados diretamente como são encontrados na natureza, acabam servindo como um modelo para o desenvolvimento de derivados sintéticos (ALBERTI et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FUNGOS FILAMENTOSOS E REATIVAÇÃO

Neste estudo, 30 fungos filamentosos isolados anteriormente a partir de amostras de solo de um coqueiral, localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil (MACHADO, 2015), foram avaliados quanto à produção de substâncias com potencial antimicrobiano frente a diferentes isolados clínicos.

Os fungos encontram-se armazenados de duas maneiras: 1) em água destilada esterilizada, segundo a metodologia proposta por Castellani (1939) e 2) em tubos inclinados contendo BDA (Batata Dextrose Ágar - Anexo A), a 4°C.

A reativação dos fungos procedeu-se a partir do estoque de tubos inclinados, preservados a -4 °C. Para cada linhagem, retirou-se uma alçada, a qual foi inoculada em placa de Petri contendo 20 mL de BDA. As placas foram incubadas a 30 °C, por 5 dias.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

3.2.1 Microcultivo em lâmina

Os fungos foram identificados pela técnica de microcultivo em lâmina, proposta por Riddel (1950), com adaptações. Para a realização da mesma, os fungos foram previamente inoculados em placas de Petri contendo 20 mL do meio CYA (*Czapek Yeast Extract Agar* - Anexo B), utilizando uma alça de platina em formato de “L”. Um pequeno fragmento da colônia foi inoculado no centro do meio de cultura. Sobre o meio inoculado, colocou-se uma lamínula previamente esterilizada. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), a 25 °C, durante 7 dias. Após crescimento adequado, a lamínula, com o micélio aderido, foi retirada do ágar, invertida e colocada sobre uma lâmina de vidro limpa contendo uma gota do corante lactofenol azul de Amann. Em seguida, foi examinada ao microscópio óptico. Este procedimento encontra-se ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da técnica de microcultivo em lâmina proposta por Riddel, 1950 (com adaptações)



Fonte: O autor

Todas as linhagens foram submetidas à observação das características morfológicas. Para a análise macroscópica, foram consideradas os seguintes caracteres: diâmetro da colônia; cor da colônia e do reverso; presença de pigmento solúvel e formação de exsudato. As características microscópicas observadas foram: seriação; morfologia e cor dos conídios; forma e diâmetro da vesícula; presença de cleistotécio. Literaturas de referência foram utilizadas para auxiliar a identificação (KLINCH e PITT, 1988; RARPER e FENNELL, 1965; SAMSON, 1974).

3.2.2 Identificação molecular

3.2.2.1 Extração do DNA dos fungos

Para obtenção da massa micelial, seguiu-se o protocolo proposto por Andrade (2015), com adaptações. Para a extração do DNA, todas as cepas fúngicas foram cultivadas em BDA e incubadas a 30 °C, por 120 horas. Decorrido este tempo, retirou-se 5 blocos de gelose medindo 8 mm de diâmetro, utilizando um cortador de colônias esterilizado. Os blocos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de BD (Caldo Batata Dextrose – Anexo C) e encaminhados para uma incubadora de agitação rotativa a 150 rpm, a 30 °C, por 72 horas.

O micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro de malha 0,45 µm previamente esterilizado. Em seguida, foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada, a fim de eliminar quaisquer resquícios de meio de cultivo e/ou outros interferentes. O micélio de cada linhagem foi congelado em nitrogênio líquido e macerado, com o auxílio de grau e pistilo, até formar um pó fino

(RAEDER; BRODA, 1985). As extrações de DNA foram realizadas utilizando o *HiPurA™ Fungal DNA Purification Kit* (Himedia), seguindo as especificações do fabricante.

A efetividade do procedimento foi avaliada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA – Anexo J), corado com 0,1 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *Sybr Safe®*. Cinco μL do DNA extraído foram misturados a 3 μL de tampão de amostra (Anexo K) e aplicados nos poços do gel. O resultado foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

3.2.2.2 Amplificação e sequenciamento da região ITS

A região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi amplificada através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), utilizando os *primers* universais ITS1 (5'–TCCGTAGGTGAACCTGCGG– 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC –3'). A reação teve um volume final de 25 μL . As concentrações finais de cada componente da reação estão dispostas a seguir, no Quadro 3.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador, programado com uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação 95 °C por 30 segundos, anelamento a 62 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Quadro 3 - Componentes das reações de amplificação dos genes ITS 1 e 4 por PCR

Reagentes	Concentração final para uma reação
DNA molde	50 ng. μL^{-1}
Tampão de reação (20 mM Tris-HCl; pH 8.0)	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
Oligonucleotídeo direto (<i>Primer forward</i>)	0,4 mM
Oligonucleotídeo reverso (<i>Primer reverse</i>)	0,4 mM
Taq DNA polimerase	0,04 U
Água Milli Q esterilizada	q.s.p. 25 μL

Após a amplificação, a efetividade da reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5x concentrado, corado com 0,1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de Sybr Safe®. Para tanto, 5 μL da amostra amplificada foi misturada a 3 μL de tampão de amostra e aplicados no poço. Utilizou-se um marcador de peso molecular de 1 Kb. O resultado foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

A concentração final de DNA amplificado foi determinada usando o equipamento *Nanodrop Spectrophotometer*®. O material foi armazenado a -20 °C, até uso.

As amostras foram sequenciadas pela empresa Macrogen (Coreia do Sul) e as sequências comparadas no *GenBank* utilizando o *software* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências foram alinhadas com *software* Clustal e a árvore filogenética foi construída utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), versão 6.0. A topologia foi avaliada pela análise *bootstrap* (1000 *resampling*). Os números de registro das sequências no *Genbank* encontram-se no Apêndice A.

3.2.2.3 Caracterização molecular por PCR-RFLP

A caracterização molecular dos isolados, em nível de espécie, foi realizada pela técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction* - “*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os produtos da amplificação da PCR de todas as cepas foram submetidos ao tratamento com duas enzimas de restrição: *HhaI* e *MwoI*. As reações de digestão enzimática dos produtos da PCR de todas as linhagens foram realizadas utilizando os reagentes citados no Quadro 4.

Quadro 4 - Volumes dos reagentes utilizados na digestão enzimática dos produtos de PCR dos fungos, utilizando as enzimas *HhaI* e *MwoI*

Reagentes	<i>HhaI</i>	<i>MwoI</i>
Produto de PCR	15,0 μL	15,0 μL
Enzima	1,0 μL	1,0 μL
Tampão	2,0 μL	2,5 μL
Água Milli Q esterilizada	-	1,5 μL

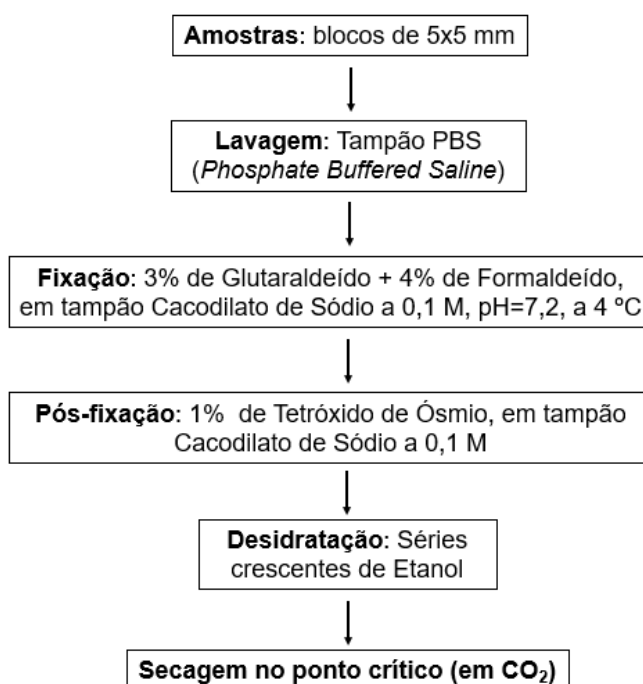
(Fonte: DIBA et al., 2014 e KIZIS et al., 2014, com adaptações)

Após o preparo das reações, os tubos foram incubados a 37 °C, por 120 minutos. A visualização dos fragmentos gerados pela PCR-RFLP foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2,0% em TBE 0,5x concentrado, corado com 0,1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *Sybr Safe*®. Para tanto, todo o volume de reação foi adicionado ao poço do gel juntamente a 4 μL de tampão de amostra. Para determinar o tamanho dos fragmentos gerados, utilizou-se um marcador de 100 pares de base (pb). Os géis foram observados em transiluminador de luz UV e fotodocumentados.

3.3 CARACTERIZAÇÃO ULTRA ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Seis cepas (*Aspergillus terreus* URM 7731, *A. fischeri* URM 7737, *Paecilomyces varitotti* URM 7739, *A. niger* URM 7748, *A. nidulans* URM 7810, *A. fumigatus* URM 7811) foram inoculadas em meio CYA, seguindo o procedimento descrito no item 3.2.1. Após o crescimento, discos de micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram retirados e submetidos ao procedimento indicado na Figura 9:

Figura 9 - Representação esquemática da técnica utilizada para caracterização ultra estrutural das espécies fúngicas por Microscopia Eletônica de Varredura (MEV)



Fonte: FISCHER et al., 2012 (com adaptações)

As amostras foram colocadas em suportes metálicos e revestidas com uma fina camada de ouro (20 nm), em um dispositivo de pulverização catódica no Q150T (Quorum Technologies). As amostras foram examinadas usando o microscópio eletrônico de varredura, modelo EVO LS 15, operando a 10 kV.

3.4 NÚMEROS DE REGISTRO

Depois de identificados, os fungos foram encaminhados para depósito na Micoteca URM, localizada no Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Os respectivos números de identificação encontram-se no Apêndice A.

Os trabalhos desenvolvidos utilizando os fungos filamentosos identificados neste estudo foram registrados na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). O isolamento e a identificação das linhagens estão registrados pelo código A0A0C4D, enquanto que a investigação da atividade antimicrobiana tem como código de registro AFF38A2.

3.5 SCREENING: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.5.1 Micro-organismos teste

Todos os micro-organismos utilizados nos testes de avaliação do potencial antimicrobiano dos fungos filamentosos foram cedidos pela Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). As linhagens e seus códigos de referência são citados a seguir, no Quadro 5.

3.5.2 Suspensões dos micro-organismos teste

Para obter as suspensões microbianas, as bactérias foram previamente cultivadas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion* - Anexo F) e incubadas a 37 °C por 24

horas. Já a levedura foi incubada em ágar Sabouraud (Anexo G), a 30 °C, por 24 a 48 horas.

Quadro 5 - Micro-organismos utilizados na investigação do potencial antimicrobiano dos fungos filamentosos isolados do solo de um coqueiral, localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil

Micro-organismos-teste	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA-02
<i>Staphylococcus aureus</i> (MDR)	UFPEDA-699
<i>Staphylococcus aureus</i> (MDR)	UFPEDA-709
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA-718
<i>Staphylococcus aureus</i> (MDR)	UFPEDA-731
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFPEDA-396
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFPEDA-416
<i>Candida albicans</i>	UFPEDA-1007

(*) MDR – *Multidrug-resistant*

As suspensões microbianas foram padronizadas de acordo com as recomendações propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) para as bactérias e Vasconcelos et al. (2015) para a levedura. As colônias isoladas foram suspensas em solução salina a 0,9%, de modo a obter suspensões diluídas com concentração final próxima a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para as bactérias e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL para a levedura. Para tanto, as densidades ópticas das suspensões foram conferidas em um espectrofotômetro. As absorbâncias em 625 nm -para as bactérias – e a 530 nm – para a levedura – deveriam estar compreendidas na faixa de 0,08 a 0,13.

3.5.3 Ensaio primário - Bloco de gelose

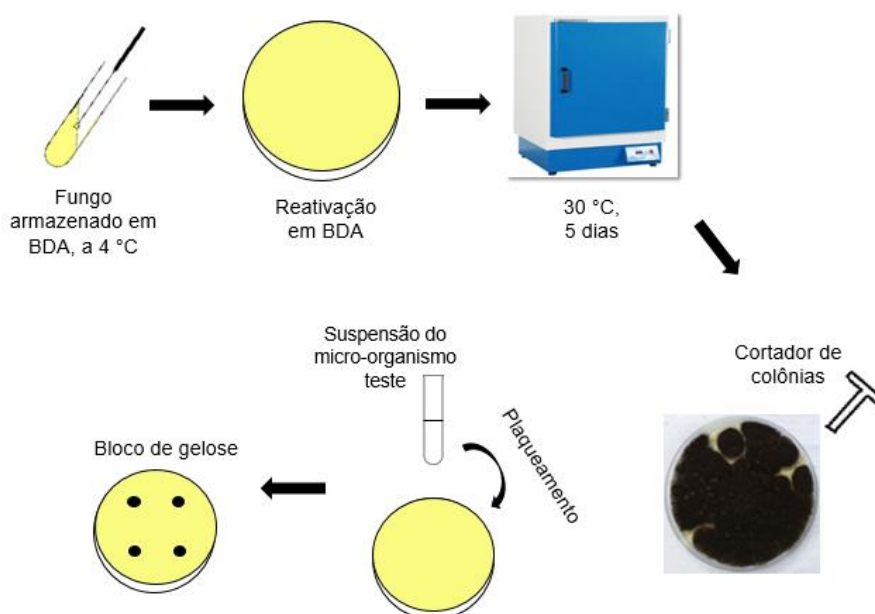
Para avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados, realizou-se um ensaio primário seguindo o protocolo proposto por Ichikawa et al. (1971) e Balouiri et al., (2016) conhecido por “Método do Bloco de Gelose” ou “Teste de difusão em Ágar”.

Todas as linhagens fúngicas foram cultivadas em BDA e incubadas a 30 °C, por 5 dias. Verificando crescimento satisfatório, foram retirados blocos medindo 8x8 mm, utilizando um perfurador esterilizado. Estes blocos foram colocados sobre os micro-organismos teste previamente plaqueados em meios específicos: ágar Mueller Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para a levedura. As placas foram incubadas

a 37 °C por 24 horas para bactérias e a 30 °C por 24 a 48 horas para a levedura. Este teste foi realizado em triplicata.

Após o período de incubação, os halos de inibição foram medidos e os resultados foram expressos em forma de média aritmética (mm). Considerou-se que houve atividade antimicrobiana quando a zona de inibição foi maior ou igual a 11 mm de diâmetro (KUMAR et al., 2014). Uma representação esquemática deste procedimento é apresentada a seguir, na Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática do teste do bloco de gelose



Fonte: O autor

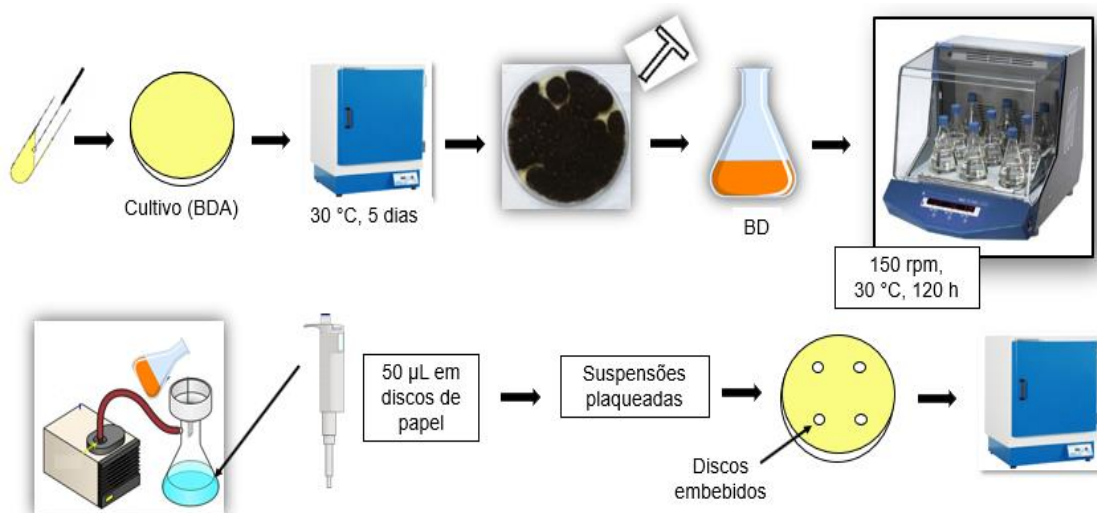
3.5.4 Ensaio secundário – Disco difusão

A atividade antimicrobiana avaliada pela metodologia de difusão em ágar seguiu as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017, com adaptações). Os isolados que apresentaram resultados promissores na etapa anterior foram selecionados para o ensaio secundário. Os fungos selecionados foram cultivados em BDA, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, 3 blocos medindo 8x8 mm foram retirados utilizando um perfurador esterilizado e inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de BD. Os frascos foram submetidos a agitação de 150 rpm, a 30 °C, durante 120 horas.

Decorrido o tempo de cultivo, o caldo fermentado foi obtido por filtração a vácuo, utilizando papéis de filtro esterilizados de malha 0,45 μm .

Para esta etapa, foram utilizados os mesmos micro-organismos teste e procedimentos citados no Quadro 5. O plaqueamento das suspensões microbianas e a incubação das placas seguiu o procedimento descrito no item 3.5.2. Discos de papel medindo 8x8 mm, previamente esterilizados, foram impregnados com 50 μL dos caldos fermentados e, posteriormente, foram colocados sobre os micro-organismos teste previamente plaqueados. As placas foram incubadas e os halos de inibição foram medidos (mm). Este teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética. Um esquema da realização desta etapa representado a seguir, na Figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática do método de disco difusão



Fonte: O autor

3.6 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

O isolado que apresentou melhores resultados na avaliação da atividade antimicrobiana foi selecionado para as etapas subsequentes. Inicialmente, a fim de investigar a influência de diferentes condições de cultivo no potencial antimicrobiano do fungo, dois parâmetros foram avaliados: meio e tempo de cultivo. Os 3 meios de cultivo avaliados foram: BD (SHU et al., 2013; PADHI e TAYUNG, 2015. Anexo C),

Extrato de Malte a 1,5% m/v (KAOUADJI et al., 1993; PADHI e TAYUNG, 2015. Anexo D) e Czapek modificado (SINGH et al., 2015. Anexo E).

O fungo selecionado foi cultivado em BDA e incubado a 30 °C, por 5 dias. Posteriormente, 3 discos de micélio medindo 8x8 mm foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL dos meios citados acima. Os frascos foram encaminhados para agitação a 150 rpm, a 30 °C, durante 120 horas. A cada 24 horas, um frasco de cada meio foi retirado a fim de avaliar o melhor tempo de cultivo com relação à produção dos metabólitos.

Os caldos fermentados foram obtidos por filtração a vácuo, utilizando papéis de filtro esterilizados. A biomassa foi utilizada para avaliar o crescimento celular por peso seco. O líquido metabólico foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana, por disco difusão (item 3.5.4), frente a cepas de *S. aureus* (sem padrão de resistência e cepas resistentes; Quadro 5). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram obtidos por média aritmética de cada variável.

Após determinar as condições de meio e tempo de cultivo, foi avaliada a influência do pH na produção do metabólito secundário pelo isolado *Aspergillus terreus* URM 7731. Assim, 6 diferentes pH foram testados, variando de 4,0 a 9,0. Para isso, utilizou-se HCl e NaOH para acidificar ou alcalinizar o meio, antes de autoclavá-lo. Três discos de micélio de 8x8 mm do fungo previamente cultivado em BDA foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de extrato de malte a 1,5%, com diferentes pH. Os frascos foram encaminhados para agitação a 150 rpm, a 30 °C, por 96 horas. A biomassa foi utilizada para avaliar o crescimento celular, por peso seco. Os caldos fermentados foram obtidos por filtração a vácuo e utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana, por disco difusão. As suspensões bacterianas foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton. Sobre elas, foram colocados os discos de papel embebidos com 50 µL dos caldos fermentados. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram obtidos por média aritmética de cada variável avaliada.

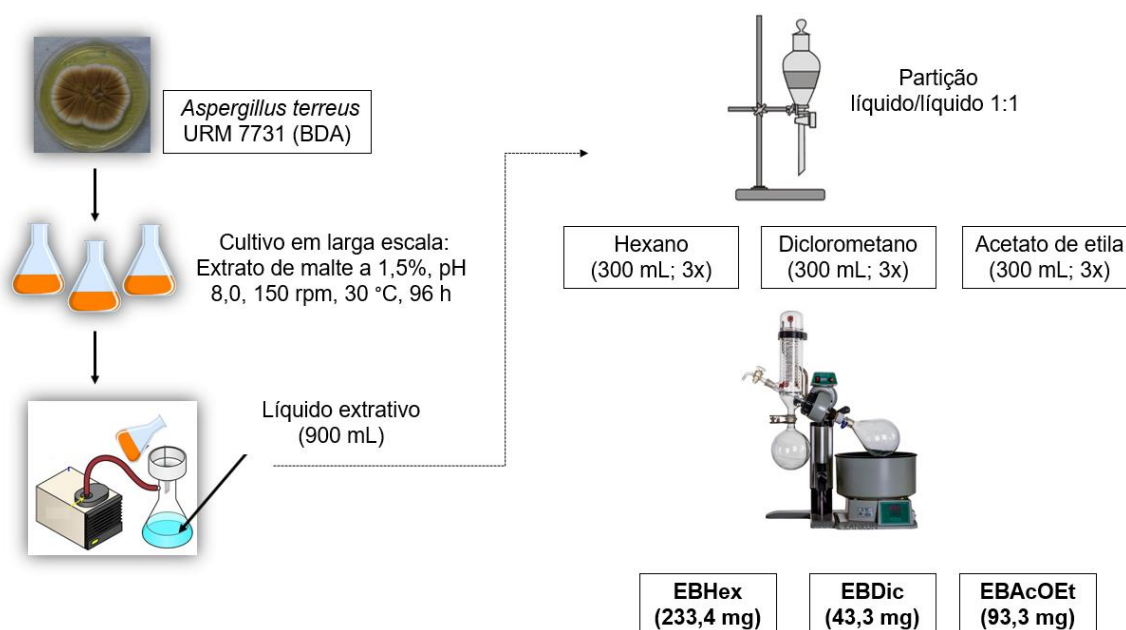
3.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Após determinar as melhores condições, foram realizados cultivo em larga escala para proceder a extração dos metabólitos ativos. O isolado *Aspergillus terreus* URM 7731 foi cultivado em BDA. Após 5 dias de incubação, 5 discos e micélio

medindo 8x8 mm foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de extrato de malte a 1,5%, pH 8,0. Os frascos foram incubados a 150 rpm, a 30 °C, por 96 horas.

O caldo fermentado foi separado da biomassa por filtração a vácuo, utilizando papéis de filtro esterilizados. A extração dos metabólitos secundários foi realizada por partição líquido/líquido (CHAPLA et al., 2014, adaptado), utilizando os seguintes solventes orgânicos: hexano, diclorometano e acetato de etila, na proporção 1:1 (v/v). O líquido filtrado foi extraído 3 vezes com cada solvente, utilizando um funil de separação. O excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro. Os solventes orgânicos foram evaporados em rotaevaporador sob pressão reduzida, a 50 °C, fornecendo os respectivos extratos brutos: EBHex, EBDic e EBAcOEt. Uma representação esquemática deste procedimento está apresentada na Figura 12.

Figura 12 - Metodologia de obtenção dos extratos brutos a partir do caldo fermentado de *Aspergillus terreus* URM 7731



Fonte: O autor

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

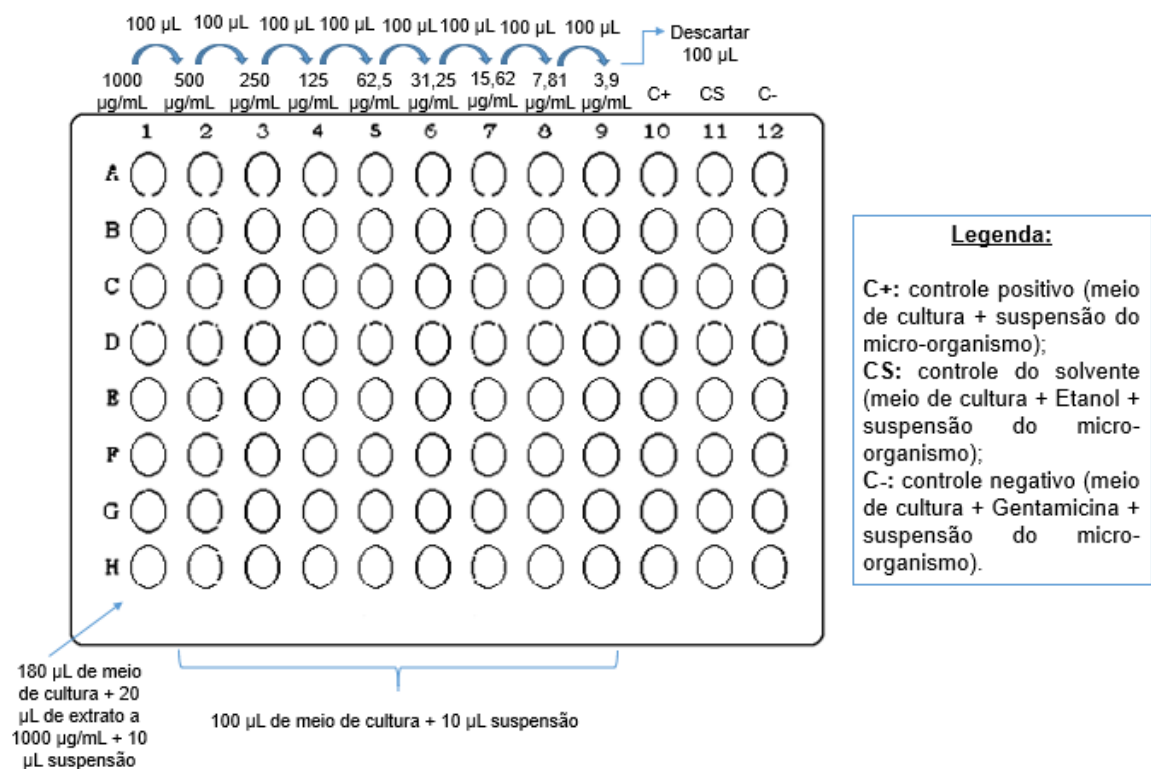
Os extratos brutos de hexano, diclorometano e acetato de etila foram avaliados quanto à Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às cepas de *Staphylococcus aureus* sem padrão de resistência (UFPEDA-02) e MDR (UFPEDA-699, UFPEDA-

709, UFPEDA-718 e UFPEDA-731). A CIM de cada extrato foi determinada pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços (CLSI, 2017).

Distribuiu-se 180 μL de meio de cultura líquido (Caldo Mueller Hinton – Anexo I) na coluna 1 e 100 μL nos poços das demais colunas. Em seguida, foram adicionados 20 μL de cada extrato bruto à coluna 1 (concentração inicial = 10.000 $\mu\text{g/mL}$, solubilizados em Etanol) e procedeu-se a diluição seriada, transferindo-se 100 μL da coluna 1 até a 9, sendo avaliadas as concentrações de 1000 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ de cada extrato. Após a diluição seriada, cada poço foi inoculado com 10 μL do inóculo microbiano padronizado, preparado segundo informações presentes no item 3.5.2 – o qual representa inóculo na ordem de 10^8 UFC/mL - e diluído, de forma que a concentração de células bacterianas nos poços resultou na ordem de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas para os controles: controle positivo, controle do solvente (Etanol) e controle negativo (Gentamicina a 60 $\mu\text{g/mL}$).

O ensaio foi realizado em triplicata para cada micro-organismo teste e as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A Figura 13 traz uma representação esquemática da investigação da CIM dos extratos brutos.

Figura 13 - Metodologia de microdiluição para determinação da CIM dos extratos



Dado o tempo de incubação, realizou-se a leitura dos resultados utilizando resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) na concentração 0,01%. Em cada poço, foram colocados 20 µL do corante, o qual possui cor azul. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 2 a 4 horas.

O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor azul) em resarufina (cor rósea), quando há crescimento microbiano (O'BRIEN et al., 2000). Portanto, a manutenção da cor azul indica ausência de crescimento, enquanto a mudança de coloração para rosa indica que houve crescimento. A CIM é representada como a concentração do último poço da diluição que apresentou a cor azul.

A Concentração Bactericida Mínima (CMB) foi determinada pelo cultivo dos poços que apresentaram turbidez, após leitura visual, antes de adicionar resazurina nos poços. O cultivo foi realizado em Ágar Müller Hinton, utilizando alça de platina. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. A CMB foi considerada como a última diluição que não apresentou crescimento microbiano em placa.

3.9 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA

Aspergillus terreus URM 7731 foi cultivado em meio líquido em escala ampliada, conforme metodologia descrita no item 2.3. Foram realizados 8 cultivos de 1,5 litros, totalizando aproximadamente 12 litros de caldo fermentado. Ao final de cada cultivo, os caldos fermentados foram separados da biomassa por filtração a vácuo e, em seguida, foram extraídos com diclorometano. O solvente orgânico foi evaporado em rotaevaporador para a obtenção dos extratos brutos EBDic, os quais foram armazenados a 4 °C até o uso.

3.10 DETERMINAÇÃO DO SINERGISMO *IN VITRO* ENTRE O EXTRATO BRUTO E ANTIBIÓTICOS: MÉTODO DO *CHECKERBOARD*

O método do *checkerboard* é comumente utilizado para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro*. Logo, esta etapa foi realizada para investigar se o extrato EBDic é capaz de reduzir a CIM de agentes antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Assim, os antibióticos utilizados no teste de sinergismo foram selecionados após a realização

de um antibiograma, a fim de confirmar a sensibilidade/resistência das cepas MDR citadas no Quadro 1 diante de diferentes agentes antibacterianos.

Os inóculos das cepas UFPEDA-699, UFPEDA-709, UFPEDA-718 e UFPEDA-731 foram padronizados segundo metodologia descrita no item 2.1.2. Utilizou-se a metodologia de disco difusão descrita por Kirby-Bauer (1966), o qual propõe que as suspensões padronizadas sejam semeadas em placas contendo Ágar Mueller Hinton. Em seguida, discos contendo quantidades padronizadas de antibióticos foram dispostos sobre as placas semeadas. Foram utilizados os seguintes agentes antibacterianos: cefoxitina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) e oxacilina (1 µg). As placas foram incubadas a 37 °C, durante 18 horas. Este teste foi realizado em triplicata. Os halos de inibição foram medidos e os resultados foram obtidos por média aritmética.

Os perfis de sensibilidade/resistência das cepas UFPEDA-699 e UFPEDA-709 fizeram com que as mesmas fossem selecionadas para a determinação do sinergismo *in vitro*. Na realização desta etapa, utilizou-se gentamicina e ciprofloxacina para UFPEDA-699 e oxacilina e ciprofloxacina para UFPEDA-709.

O estudo da interação entre EBDic e os antibióticos foi realizado segundo metodologia proposta por Lorian (2005). Inicialmente, deve-se determinar a CIM de todos os compostos a serem avaliados frente às linhagens de interesse. Logo, a CIM dos antibióticos foi determinada utilizando método de microdiluição em placa de 96 poços (item 2.4). Para tanto, os mesmos foram testados em concentrações que variaram de 15 a 960 µg/mL.

Com base nos valores da CIM, foram preparadas soluções de EBDic (solubilizado em etanol a 100%) e dos antibióticos (solubilizados em água destilada previamente esterilizada) em concentrações 4 vezes maior ($CIM \times 4$). As suspensões bacterianas foram padronizadas segundo metodologia descrita no item 2.1.2, porém a concentração de células foi ajustada para $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, utilizando solução salina a 0,9% para realizar a diluição.

Para cada dupla de amostras (por exemplo, EBDic + ciprofloxacina), foram utilizadas 2 microplacas de 96 poços, sendo uma para realização do teste (Placa 1) e outra para diluição da amostra (Placa 2). Na Placa 1, foram distribuídos 100 µL de Caldo Mueller Hinton (Anexo I) nas colunas 1 a 10, enquanto na Placa 2 a distribuição ocorreu nas colunas 1 a 8. Na Placa 1, foram adicionados 100 µL da solução do agente

antimicrobiano, diluído previamente, de modo a obter uma concentração CIM $\times 4$, sendo que esta distribuição ocorreu na linha A, colunas 1 a 8. Após homogeneizar, realizou-se uma diluição seriada, coletando 100 μL da linha A e transferindo para linha B, e assim procedendo até a linha G, da qual foram descartados 100 μL ao final do procedimento. Vale ressaltar que a linha 9 serviu para avaliar o controle positivo, ao passo que a linha 10 foi utilizada para avaliar o controle negativo.

A diluição do extrato EBDic foi realizada na Placa 2. Um volume de 100 μL do extrato, previamente diluído na concentração CIM $\times 4$, foi adicionado na coluna 8, nas linhas de A a H. Realizou-se uma diluição seriada, na qual, após homogeneização, 100 μL foram transferidos da coluna 8 para a coluna 7, e assim sucessivamente até a coluna 2. Ao final da diluição, 100 μL foram descartados da mesma.

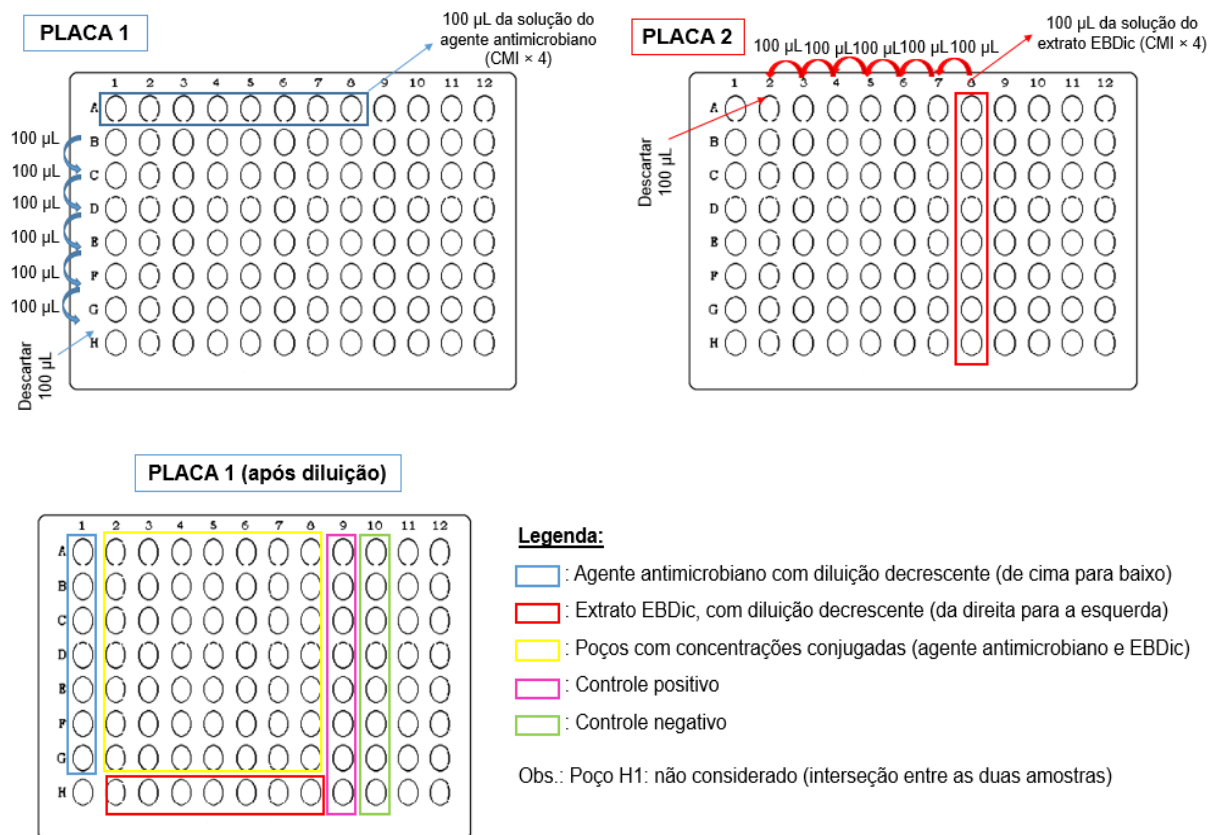
A denominação “*checkerboard*” refere-se ao padrão de diluição das substâncias avaliadas distribuídas na microplaca, pois os volumes da Placa 2 foram transferidos para a Placa 1, a fim de avaliar concentrações diferentes das duas substâncias em um mesmo volume final. Assim, todo o conteúdo da coluna 8 da Placa 2 foi transferido para a coluna 8 da Placa 1, homogeneizado e, posteriormente, 100 μL foram descartados. O mesmo procedimento foi realizado para as demais colunas.

Ao final das diluições das duas substâncias, 10 μL da suspensão do micro-organismo foram adicionados a cada poço. Ao final, tem-se todas as amostras em suas devidas concentrações, sendo o poço mais concentrado equivalente a CIM, diminuído sempre pela metade a cada poço. Todo este procedimento está ilustrado a seguir, na Figura 14.

A microplaca foi incubada a 37 °C, por 18 a 24 horas. Decorrido este tempo, procedeu-se a revelação da placa utilizando o corante resazurina na concentração 0,01% (item 3.8).

Os resultados foram analisados a partir do cálculo do FICI (*Fraction Inhibitory Concentration Index*). Observou-se o poço que possuía a menor concentração do agente antimicrobiano em que não houve crescimento bacteriano.

Figura 14 - Método do *checkerboard*, utilizado para avaliação do sinergismo entre o extrato bruto e os antibióticos



Fonte: O autor.

O FICI foi calculado segundo a equação:

$$FICI = FICA + FICB$$

Onde:

FICI: *Fraction Inhibitory Concentration Index*

FICA: *Fraction Inhibitory Concentration* do agente antimicrobiano

FICB: *Fraction Inhibitory Concentration Index* do extrato EBDic

Para calcular FICA e FICB, utilizou-se as seguintes equações:

$$FICA = \frac{CMI \text{ (Conjugada A+B)}}{CMI \text{ A (isoladamente)}} ; \quad FICB = \frac{CMI \text{ (Conjugada A+B)}}{CMI \text{ B (isoladamente)}}$$

Para análise dos resultados, foram considerados os seguintes parâmetros: $FICI < 0,5$ = Efeito sinérgico; $0,5 \leq FICI \leq 0,75$ = Efeito parcialmente sinérgico; $0,75 < FICI < 2$ = Efeito aditivo; $2,0 \leq FICI \leq 4,0$ = Efeito indiferente; $FICI > 4,0$ = Efeito antagônico.

3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO BRUTO AO BIOFILME EM FORMAÇÃO

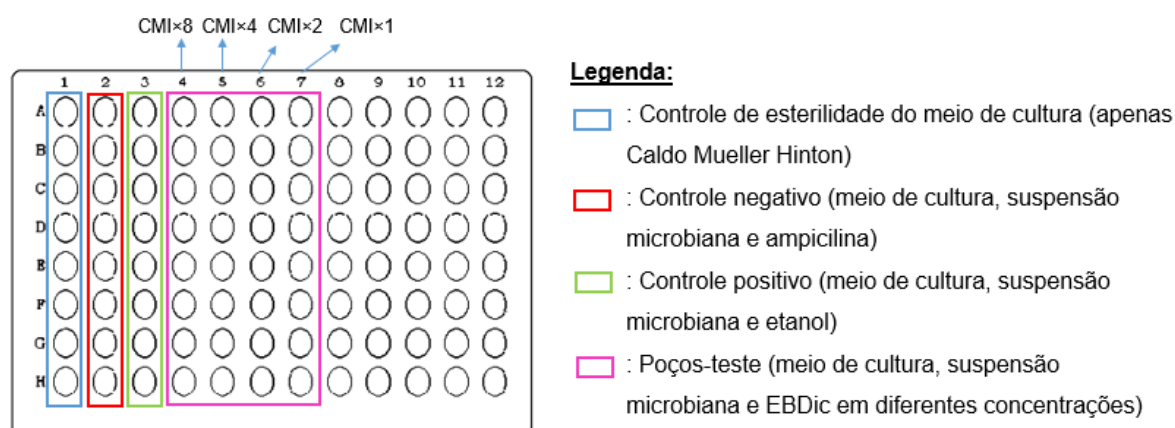
A análise da atividade do extrato EBDic frente ao biofilme em formação da linhagem *S. aureus* UFPEDA-02 foi realizada segundo protocolo proposto por Ferreira et al. (2018), utilizando microplacas de 96 poços, compostas de poliestireno. No teste, 80 μ L da suspensão microbiana ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), 80 μ L do extrato EBDic solubilizado em etanol (em diferentes concentrações, baseados no valor da CIM frente a linhagem UFPEDA-02: CIM $\times$ 8, CIM $\times$ 4, CIM $\times$ 2 e CIM $\times$ 1) e 40 μ L de Caldo Mueller Hinton (Anexo I) foram adicionados em cada poço-teste (colunas 4 a 7, respectivamente).

A coluna 1 foi utilizada para controle de esterilidade do meio, ao passo que as colunas 2 e 3 foram realizados o controle negativo (meio de cultura, suspensão microbiana e ampicilina a 960 μ g/mL) e o controle positivo (meio de cultura, suspensão microbiana e etanol), respectivamente. A montagem da placa segue representada a seguir, na Figura 15.

A microplaca foi incubada a 37 °C, por 24 horas. A avaliação da capacidade de EBDic em inibir a formação do biofilme foi avaliada utilizando um leitor de microplacas no comprimento de onda de 630 nm, após tratamento das amostras contidas em cada poço.

O conteúdo dos poços foi cuidadosamente removido utilizando uma micropipeta multicanal. As células não-aderidas aos poços foram removidas utilizando 200 μ L de solução salina a 0,9%, com 3 lavagens seguidas. O biofilme foi fixado utilizando 200 μ L de metanol a 100%, por 20 minutos. Decorrido este tempo, o metanol foi removido e a microplaca foi incubada a 50 °C, por 60 minutos.

Figura 15 - Esquema representativo da distribuição dos compostos na microplaca de 96 poços para investigação da inibição de formação de biofilme por EBDic



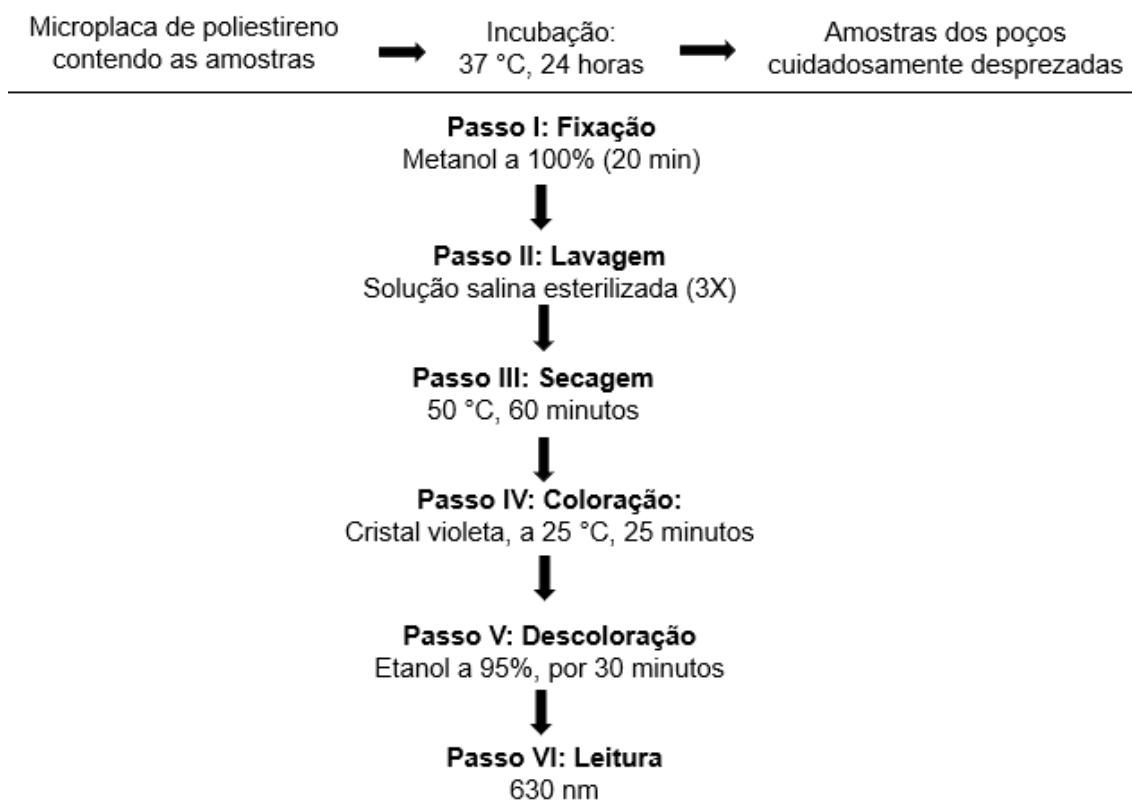
Fonte: O autor

Em seguida, procedeu-se a coloração do biofilme, utilizando 200 μ L de cristal violeta a 0,4% (v/v) e incubando a placa a 25 ° C por 25 minutos. O corante foi removido e seu excesso foi retirado utilizando água destilada. Após secagem à temperatura ambiente, procedeu-se a descoloração utilizando 200 μ L de etanol a 95%, por 30 minutos. Em seguida, procedeu-se a leitura. A Figura 16 traz uma representação esquemática deste procedimento.

Considerou-se que a formação de biofilme no controle (meio de cultura, suspensão microbiana e etanol) representa 100% da formação de biofilme. Os potenciais de inibição da formação do biofilme pelo controle negativo e pelas diferentes concentrações de EBDic foram avaliados segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{\text{OD}_{630\text{nm}} \text{ amostra}}{\text{OD}_{630\text{nm}} \text{ controle}} \right] \times 100$$

Figura 16 - Representação esquemática da metodologia de avaliação do potencial anti-formação de biofilme



Fonte: O autor

3.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.12.1 Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método descrito por Yen et al. (2018), com modificações. Um total de 1,0 mL de solução de Folin (1:10 v/v) foi adicionado a 0,5 mL do extrato EBDic solubilizado (500 µg/mL). Decorridos 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, os ensaios foram protegidos da luz por 3 minutos e 1,5 mL de Na₂CO₃ a 7,5% foi adicionado. Em seguida, os sistemas foram novamente incubados e protegidos da luz a 25 °C, durante 120 minutos. Decorrido o tempo de incubação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. Água destilada foi usada como branco. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética.

Uma curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido gálico (0-500 µg/mL) apresentou a seguinte equação linear: $Y = 0,0048x + 0,0016$, $R^2 = 0,9999$. Os fenóis foram indicados em equivalente de ácido gálico (mgAGE/g de EBDic).

3.12.2 Atividade Antioxidante Total (AAT)

A atividade antioxidante total promovida pelo extrato EBDic foi determinada em função do ácido ascórbico, de acordo com Sanjukta et al. (2015). Um volume de 1,0 mL de EBDic na concentração de 800 µg/mL foi misturado a 1,0 mL de solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de sódio fosfato e molibdato de amônio 4 mM), sendo incubado em água, a 95 °C, durante 90 minutos. Depois de regressar à temperatura ambiente, os absorventes são medidos em espectrofotômetro a 695 nm contra um branco (1,0 mL de solução e 0,1 mL de água). Uma curva padrão com ácido ascórbico (0 - 500 µg/mL) foi construída, obtendo a equação: $Y = 0,0697x + 0,2268$, $R^2 = 0,9928$. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética. A atividade antioxidante total foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$ATT (\%) = \left[\frac{(As - Ab)}{(Aaa - Ab)} \right] \times 100$$

Onde:

Ab = Absorvância em branco;

As = Absorvância da amostra;

Aaa = Absorvância do Ácido Ascórbico.

3.12.3 Atividade de eliminação de radicais DPPH

A capacidade de sequestro de radicais livres pelo extrato EBDic foi medida usando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), como descrito por Kumar et al. (2014), com modificações. Utilizando 0,32 mL de EBDic na concentração de 800 µg/mL, foram adicionados 2,0 mL da solução de DPPH 1 mM em metanol. Após o

tempo de incubação de 25 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz, as absorbâncias foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se como controle a solução de DPPH adicionada ao metanol, sendo que metanol foi utilizando como branco. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética. O sequestro de radicais DPPH foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Efeito de eliminação (\%)} = \left[\frac{(A_c - A_s)}{(A_c)} \right] \times 100$$

Onde:

A_c = Absorbância do controle;

A_s = Absorbância da Amostra.

3.12.4 Atividade de eliminação de cátions radicais ABTS

A atividade de eliminação de cátions radicais ABTS (*2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) foi realizada usando o método proposto por Yen et al. (2018), com modificações. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de ABTS a 7 mM, utilizando etanol como diluente, e uma solução de persulfato de potássio a 140 mM. O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante 16 horas. Em seguida, 1,0 mL desta mistura foi diluído em etanol até uma absorbância de 0.70 nm ± 0.05 nm a 734 nm em espectrofotômetro. Um volume de 30 µL de EBDic na concentração de 800 µg/mL foi misturado a 3,0 mL de solução ABTS, após 5 minutos da mistura inicial. Como controle, foi utilizada a solução ABTS adicionada ao etanol e como branco utilizou-se etanol. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética. A inibição percentual foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Efeito de eliminação (\%)} = \left[\frac{(A_c - A_s)}{(A_c)} \right] \times 100$$

Onde:

A_c = Absorbância da solução ABTS sem amostra;

A_s = Absorbância da amostra.

3.13 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

3.13.1 Cromatografia em Coluna *flash*

O extrato EBDic (800 mg) foi dissolvido em diclorometano, misturado com sílica e evaporado, até formar um pó fino. Esse material foi fracionado utilizando cromatografia em coluna *flash* (26,5 x 2,6 cm), utilizando sílica gel (230 – 400 Mesh) e inicialmente empacotada com hexano. Como fase móvel, a amostra foi eluída utilizando-se um gradiente crescente de polaridade, composto pelos solventes hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt - 9:1; 8,5:1,5; 8:2; 7,5:2,5; 7:3; 6,5:3,5; 6:4; 1:1 v/v). Ao passo que as frações eram recolhidas, eram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas de alumínio TLC contendo Sílica Gel 60 F254. As 275 frações coletadas foram reunidas em 20 frações baseando-se nos perfis de eluição que obtiveram. Após serem concentradas à temperatura ambiente, foram reavaliadas por CCD para confirmar o perfil de eluição. As frações e os gradientes de eluição utilizados estão descritos na Tabela 1.

As 20 frações foram encaminhadas para investigação da atividade antimicrobiana. Realizou-se a determinação da CIM e da CMB das frações, previamente solubilizadas em etanol. Para tanto, utilizou-se o protocolo descrito no item 2.4. As frações foram avaliadas nas concentrações de 1000 a 3,9 µg/mL.

Tabela 1 - Fracionamento do extrato EBDic, gradiente de eluição utilizado e rendimento das frações

Frações	Tubos coletados	Gradiente de eluição
F-1	1 a 9	9:1
F-2	10 a 19	8,5:1,5
F-3	20 a 29	8,5:1,5
F-4	30 a 35	8,5:1,5
F-5	36 a 43	8,5:1,5
F-6	44 a 52	8,5:1,5
F-7	53 a 62	8,5:1,5
F-8	63 a 69	8,5:1,5
F-9	70 a 84	8,5:1,5
F-10	85 a 101	8,5:1,5
F-11	102 a 129	101 a 112: 8,5:1,5 113 a 129: 8:2
F-12	130 a 175	7,5:2,5
F-13	176 a 185	7:3
F-14	186 a 209	175 a 205: 7:3 206 a 209: 6,5:3,5
F-15	210 a 214	6,5:3,5
F-16	215 a 235	215 a 219: 6,5:3,5 220 a 235: 6:4
F-17	236 a 260	6:4
F-18	261 a 264	1:1
F-19	265 a 270	1:1
F-20	271 a 275	1:1

3.13.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

Esta etapa seguiu o protocolo determinado por Cruz (2013). Dois miligramas de EBDic foram dissolvidos em 60 µL de piridina. Em seguida, foram adicionados 100 µL do reagente de derivatização BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida). A mistura reacional foi aquecida a 70 °C durante 30 minutos para promover o processo

de derivatização. A amostra foi analisada em cromatógrafo a gás (CG) acoplado a espectrômetro de massas (EM) com ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV (modelo GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu), com coluna cromatográfica RTX-5MS (30 m/0.25 mm/ 0.25 μ m df). A temperatura do injetor utilizado foi de 290 °C, com temperatura inicial de análise de 80 °C por 5 minutos e posterior gradiente de temperatura de 80 a 280 °C na razão de 4 °C/minuto. O fluxo de gás (Hélio) foi de 0,8 mL/minuto, modo split. Os dados foram comparados com a biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2008).

3.13.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE/EM)

O extrato EBDic e a fração F-15 (Tabela 1) foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo da marca Shimadzu, utilizando coluna cromatográfica analítica C18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), acoplado a espectrômetro de massas (Ion-Trap AmazonX, Bruker), com Ionização por Eletrospray (IES).

Para realização da análise, pesou-se 1 mg de cada amostra, as quais foram solubilizadas separadamente em 1 mL de metanol e filtradas em filtros PVDF (Fluoreto de Polivinilideno), com malha de 0,45 μ m. O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico e água ultrapura tipo I (*Mili-Q*), acidificada com ácido fórmico (0,1%v/v) (solvente A), com análise em gradiente de concentração (5 a 100% de B em 95 minutos). O volume de injeção foi de 10 μ L e taxa de fluxo foi de 0,6 mL/minuto. No espectrômetro de massas, as amostras foram submetidas a uma fragmentação sequencial em EM². Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, *offset* da placa final 500 V, gás nebulizador 10 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 8 mL/minuto e temperatura de 300 °C.

3.13.4 Rede molecular

Os dados espectrais de EBDic e da fração F-15, obtidos por análise em CLAE/EM² no modo negativo, foram submetidos a plataforma *online* GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>). Os parâmetros utilizados

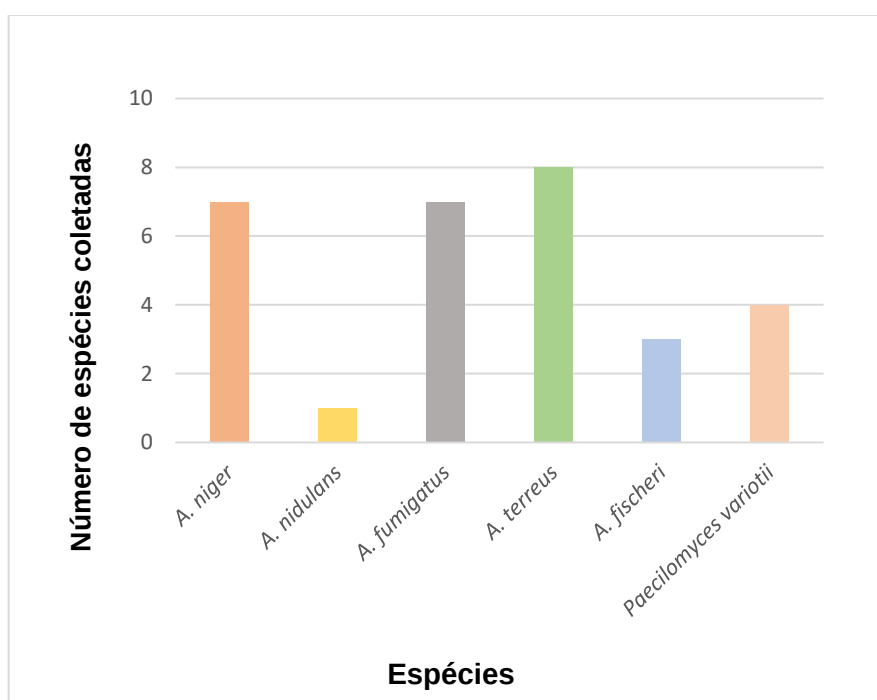
foram: cosseno acima de 0,7, com comparação de no mínimo seis íons fragmentos e até 10 ligações entre os nodos similares. Os espectros da rede foram comparados com a biblioteca espectral disponível no GNPS e todas as correspondências entre estes (anotações), foram requeridas a fim de possuir um limite de pontuação acima de 0,7 e ao menos seis picos correspondentes entre si.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, as 30 linhagens de fungos foram identificadas utilizando diferentes métodos. Através do primeiro teste de identificação realizado, o microcultivo em lâmina, os fungos foram fenotipicamente identificados em gênero e espécie, de acordo com as morfologias macro e microscópica de suas colônias crescidas em meio CYA.

De todos fungos isolados e identificados, *A. terreus* foi a espécie encontrada em maior número (8/30), seguida por *A. fumigatus* (7/30) e *A. niger* (7/30), *Paecilomyces variotii* (4/30), *A. fischeri* (3/30) e *A. nidulans* (1/30). Estes dados são ilustrados na Figura 17.

Figura 17 - Número de espécies fúngicas isoladas nas Várzeas de Sousa-PB, identificadas por microcultivo em lâmina



Fonte: O autor

A observação dos caracteres macro e microscópicos forneceu informações de suma importância para a identificação dos micro-organismos deste trabalho. As características fenotípicas dos isolados estão dispostas a seguir, nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Características macroscópicas das colônias do fungos crescidas em CYA (incubação a 25 °C, durante 168 horas)

Fungos	Diâmetro da colônia (mm)	Cor da colônia / Reverso	Pigmentos solúveis	Exsudato
<i>Aspergillus fischeri</i>	45–68	Branco / Creme	Ausente	Ausente
<i>A. fumigatus</i>	50–70	Verde / Creme	Ausente	Ausente
<i>A. nidulans</i>	51–59	Verde / Castanho	Presente	Presente
<i>A. niger</i>	62–70	Preta / Bege	Ausente	Ausente
<i>A. terreus</i>	53–62	Marrom / Marrom	Presente	Presente
<i>Paecilomyces variotii</i>	40–42	Marrom / Marrom	Ausente	Ausente

Tabela 3 - Características microscópicas dos fungos cultivados em CYA (incubação a 25 °C, durante 168 horas)

Fungos	Seriação	Tamanho dos conídios (µm)	Forma/ cor dos conídios	Forma da vesícula	Diâmetro da vesícula (µm)	Cleistotécio
<i>A. fischeri</i>	U	2–2,5	Globoso / Verde	Piriforme	12,0–18,0	Presente
<i>A. fumigatus</i>	U	2–3,5	Globoso / Verde	Piriforme	17,5–27,5	Ausente
<i>A. nidulans</i>	B	2,4–2,7	Globoso / Verde	Piriforme	8,0–12,0	Presente
<i>A. niger</i>	B	3,0–5,0	Globoso / Preta	Globosa	27,0–55,0	Ausente
<i>A. terreus</i>	B	2–2,5	Globoso / Marrom	Piriforme	15–17,5	Ausente
<i>P. variotii</i>	Ausente	3,2–5,0	Elipsóide / Castanho	Vesícula ausente		Ausente

Legenda: U - unisseriado; B - bisseriado

As Figuras expostas a seguir (18–23) ilustram as características das colônias e as estruturas microscópicas citadas nas Tabelas 2 e 3.

Figura 18 - *Aspergillus fischeri* URM 7737. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Cleistotécio (MO); D) Hifas e conídios (MEV).*

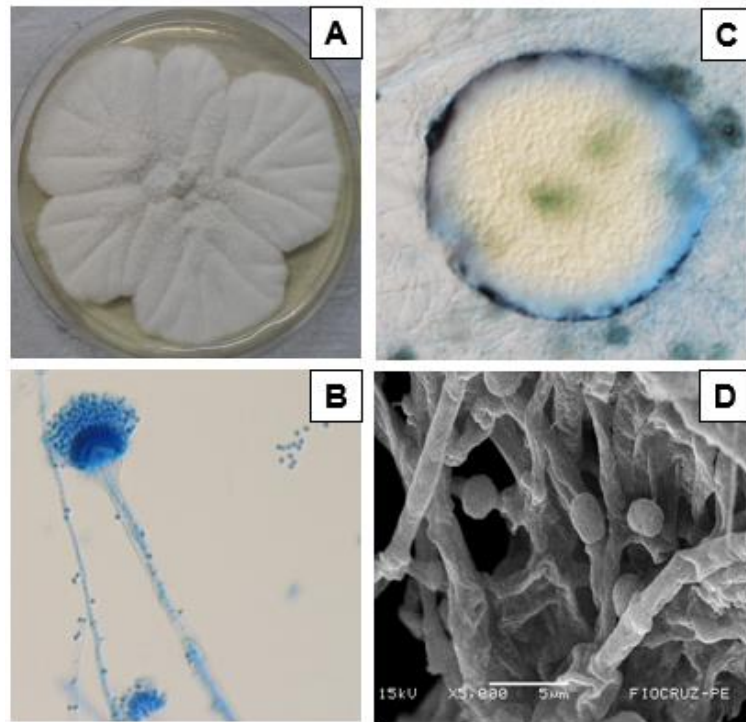
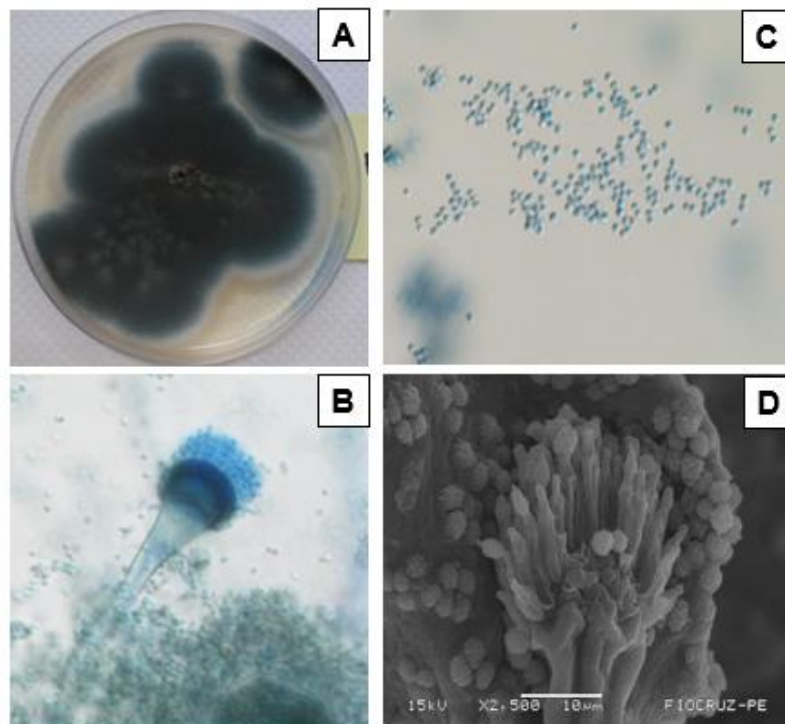


Figura 19 - *Aspergillus fumigatus* URM 7811. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Conídios (MO); D) Conídios (MEV).*



*(MO): Microscopia Ótica; (MEV): Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 20 - *Aspergillus nidulans* URM 7810. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Cleistotécio (MO); D) Conídios (MEV).*

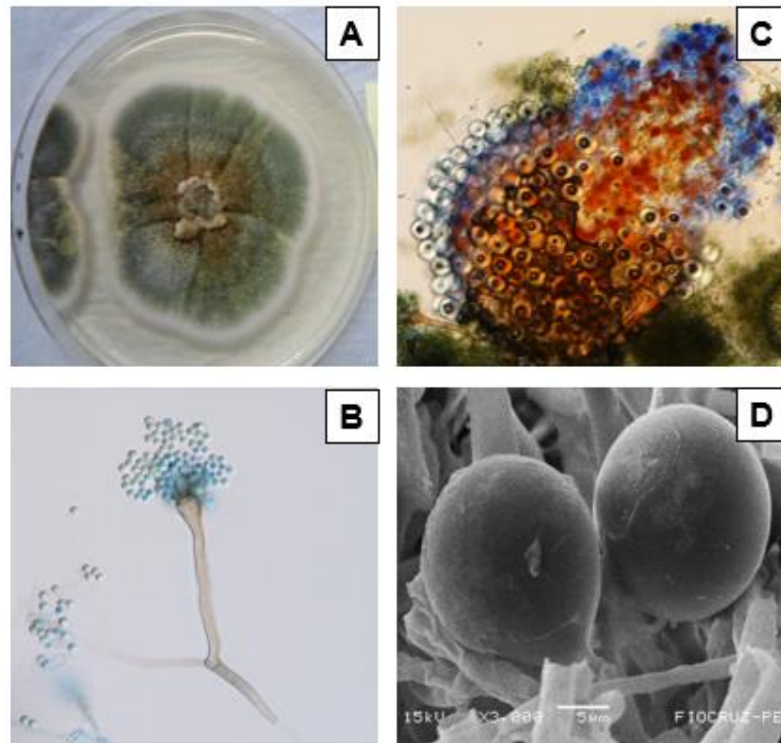
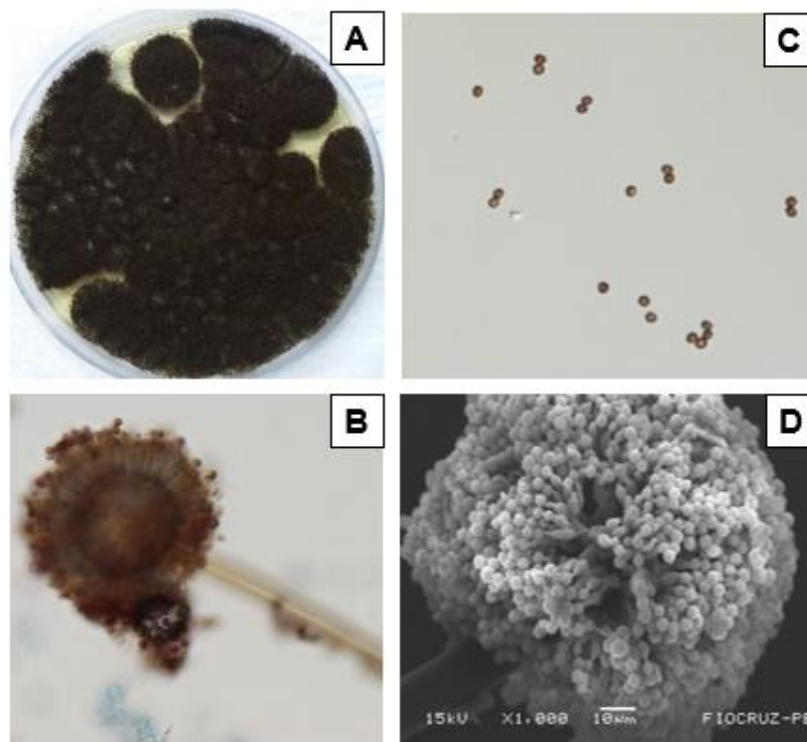


Figura 21 - *Aspergillus niger* URM 7748. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Conídios (MO); D) Conídios (MEV).*



*(MO): Microscopia Ótica; (MEV): Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 22 - *Aspergillus terreus* URM 7731. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Conidióforos, com ênfase nas cadeias de conídios (MO); D) Conídios (MEV).*

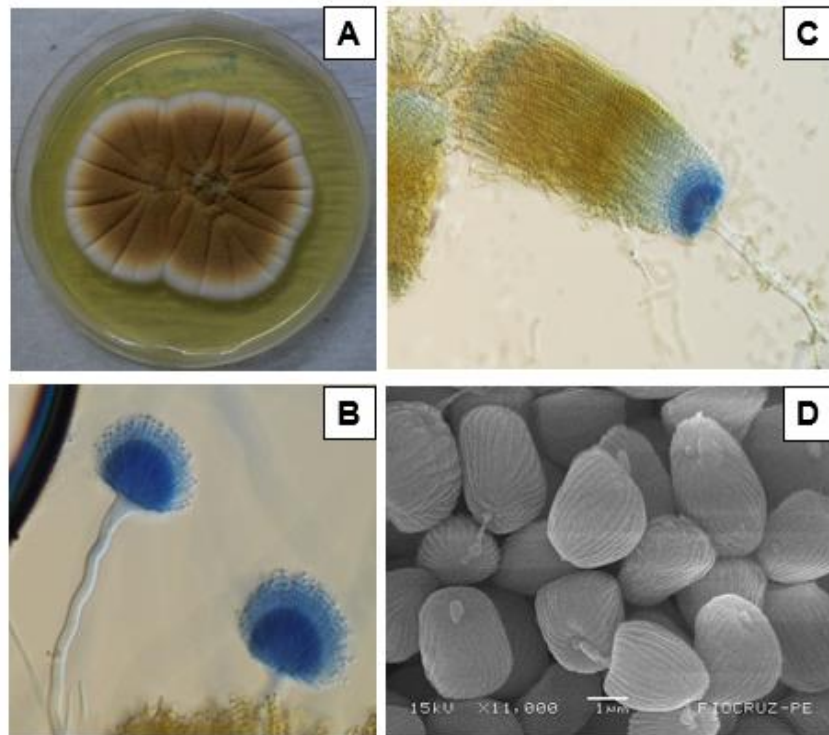
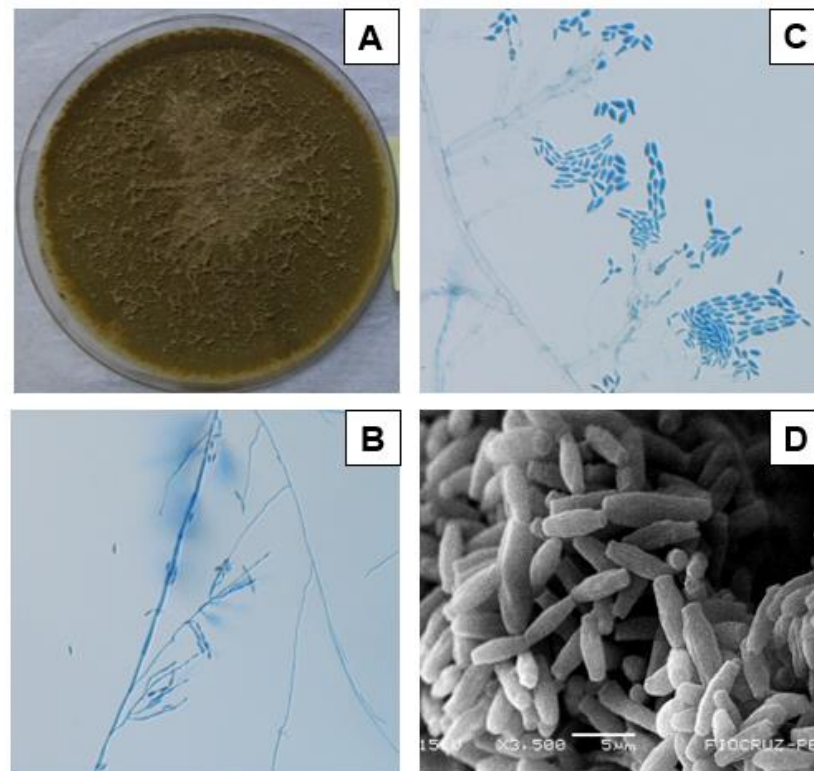


Figura 23 - *Paecilomyces variotii* URM 7739. A) Colônias cultivadas em CYA (25 °C, por 168h); B) Conidióforo (MO); C) Hifas (MO); D) Conídios (MEV).*



*(MO): Microscopia Ótica; (MEV): Microscopia Eletrônica de Varredura.

O solo é um sistema complexo que compreende fatores abióticos e bióticos, incluindo macro, meso e micro-organismos. Comunidades microbianas presentes no solo são importantes para o ciclo de nutrientes, decomposição da matéria orgânica, entre outros (LIU et al., 2016). Os fungos representam um componente funcional crucial do ecossistema subterrâneo; porém, a diversidade fúngica neste ambiente ainda é subestimada. Sabe-se que, apesar da presença de fungos no solo exercer consequências diretas na qualidade e na fertilidade, este fato tem recebido pouca atenção (MONKAI et al., 2017).

O isolamento de fungos de diferentes ambientes é importante para a avaliação da biodiversidade local. A identificação das espécies auxilia neste conhecimento, além de ser útil para avaliar os papéis que eles podem exercer no habitat em que se encontram. Ademais, pode fornecer cepas para diversas aplicações, como controle biológico, remediação ambiental e processos industriais (BLACKWELL, 2011).

Os fungos filamentosos isolados neste trabalho pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Paecilomyces*, sendo ambos ascomicetos. De acordo com Kirk et al. (2008) e Blackwell (2011), há mais de 99.000 fungos descritos e, destes, os ascomicetos e basidiomicetos constituem a grande maioria da diversidade fúngica mundial.

O gênero *Aspergillus* é bastante diverso, com alto impacto econômico e social. Suas espécies ocorrem em todo o mundo, em vários habitats e são conhecidas por deteriorar alimentos, produzir micotoxinas e, frequentemente, são relatados como patógenos humanos e animais. Porém, apesar destes pontos negativos, muitas espécies são utilizadas na biotecnologia para a produção de vários metabólitos como antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos e enzimas (SAMSON et al., 2014).

Do gênero *Paecilomyces*, observa-se que apenas a espécie *P. variotii* foi isolada neste trabalho. *P. variotii* é um fungo filamentoso saprofítico que se encontra no solo, no ar, em plantas em decomposição e em produtos alimentares (FELDMAN et al., 2016). Segundo Laguna et al. (2015), *P. variotii* merece atenção especial, não só por ser fonte de metabólitos secundários, mas também por sua capacidade de produzir uma ampla variedade de enzimas, as quais podem converter substratos baratos em bioprodutos de alto valor.

Diante da dificuldade de realizar a identificação de fungos do gênero *Aspergillus* em nível de espécie, a melhor abordagem para obter resultados mais precisos e confiáveis é a identificação polifásica, combinando métodos morfológicos e

moleculares para alcançar uma identificação final (DECONTARDI et al., 2018). Assim, decidiu-se identificar todos os fungos isolados utilizando esta abordagem.

Quanto aos fungos filamentosos, a identificação morfológica do gênero e da espécie, dependendo do fungo, requer estudo microscópico mais detalhado para delinear as estruturas características (MURRAY et al. 2015). Os mesmos autores citam que a análise microscópica fornece um delineamento importante na identificação de fungos filamentosos. Esta afirmação foi comprovada durante a execução deste trabalho, pois a observação minuciosa das características morfológicas foi crucial para uma primeira identificação das linhagens.

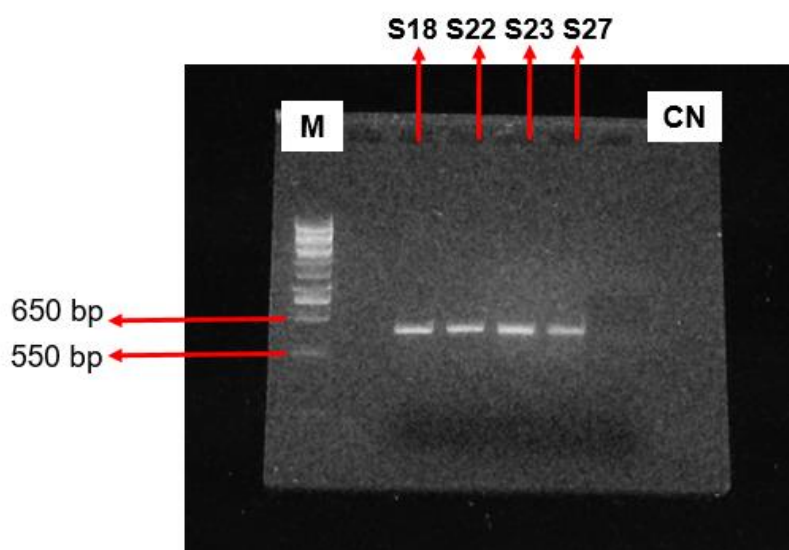
Métodos de identificação fenotípicos tradicionais, como o microcultivo em lâmina, baseiam-se principalmente nas características macroscópicas e microscópicas das espécies. Alguns autores argumentam que estes métodos são bastante demorados (na maioria das vezes, necessita-se de 5 dias ou mais para que haja desenvolvimento das colônias), trabalhosos, por vezes não suficientemente precisos e requerem um profundo conhecimento e experiência na análise morfológica de fungos (PRYCE et al., 2003; MIRHENDI et al., 2007; DIBA et al., 2014; LECELLIER et al., 2014).

Métodos mais rápidos para identificar fungos são realmente necessários, especialmente no campo clínico, no qual há relatos sobre o aumento da morbidade e mortalidade associada a infecções causadas por fungos resistentes (PRYCE et al., 2003). Rozynek et al. (2004) acrescentam que os principais problemas encontrados no processo de identificação morfológica de fungos é tempo requerido para o crescimento das colônias e a grande experiência necessária para identificar fungos em gêneros e espécies. Porém, se estas problemáticas forem superadas, havendo crescimento satisfatório das colônias e dispondo de recursos pessoais especializados no uso de chaves de identificação micológica e técnicas de cultura, tais problemas passam a ser pequenos e as técnicas tornam-se satisfatórias para a identificação dos fungos, pois exigem menos recursos financeiros do que as técnicas moleculares, sendo um ponto de partida para testes em que há necessidade de saber a identidade do micro-organismo de interesse e não se dispõe dos recursos onerosos exigidos pela biologia molecular.

O DNA dos 30 fungos isolados neste trabalho foi extraído e amplificado eficientemente. A amplificação da região ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 resultou em um produto de amplificação (produto de PCR) de

uma única banda, com aproximadamente 600 pares de bases (bp) para todas as espécies de *Aspergillus* (como exemplificado na Figura 24) e 500 bp para os isolados de *Paecilomyces variotii*.

Figura 24 - Produto da amplificação do gene ITS, correspondente a região ITS1-5.8S-ITS2 de isolados da espécie *Aspergillus terreus*, usando os *primers* ITS1 e ITS4. (M: Marcador 1Kb plus DNA Ladder; CN: Controle Negativo; S18: URM 7732; S22: URM 7733; S23: URM 7742; S27: URM 7743)



Fonte: O autor

O uso de técnicas de biologia molecular, através da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível. Essas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (MENEZES et al., 2010).

De acordo com Al-Hindi et al. (2017), várias técnicas de biologia molecular foram usadas para a detecção rápida de *Aspergillus* de amostras ambientais e clínicas. Segundo Decontardi et al. (2018) Técnicas desenvolvidas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como o sequenciamento de DNA, têm sido ferramentas úteis na identificação de vários organismos, dentre eles os fungos.

Entre os marcadores moleculares utilizados para este propósito, destaca-se o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que separa os genes 18S e 28S do rDNA e pode ser amplificada com *primers* específicos ancorados nessas duas regiões. Essa região é altamente conservada intraespecificamente, mas variável

entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção ao nível específico (FUNGARO, 2000; BARBOSA et al., 2013). No entanto, Lecellier et al. (2014) relatam que, em aplicações de rotina, estes métodos também requerem habilidades laboratoriais especiais, além de serem exigentes e caros.

O padrão de fragmento obtido da região ITS para os fungos isolados neste trabalho está dentro dos encontrados por vários autores, tanto para *Aspergillus spp.* (MAGNANI et al., 2005; MIRHENDI et al., 2007; CASTRILLO et al., 2012; TRYFINOPOULOU et al., 2015) como para *Paecilomyces spp.* (INGLIS; TIGANO, 2006; DONG et al., 2012).

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o *BLAST*, o qual estabelece comparações entre estas sequências e outras depositadas no *GenBank*, além de fornecer informações quanto à homologia entre elas. De acordo com Stackebrandt e Goebel (1994), para considerar que isolados pertencem a diferentes espécies, é necessário que ela possua uma homologia na sequência menor que 97%. Estes dados podem ser observados na Tabela 4.

Dados morfológicos e moleculares juntos podem resolver problemas taxonômicos, fornecendo resultados confiáveis, como visto neste trabalho. Os isolados *A. niger* URM 7809 e URM 7815, *A. fumigatus* URM 7811 e URM 7816 e *A. terreus* URM 7814 não foram identificados por métodos moleculares pois, diante dos testes realizados, não foi possível obter sequenciamentos confiáveis. Logo, a identificação destes isolados foi realizada usando seus caracteres morfológicos macro e microscópicos, em comparação com as literaturas de referência.

Utilizando os sequenciamentos definidos, árvores filogenéticas das cepas foram geradas para de *Aspergillus* (Figura 25) e *Paecilomyces* (Figura 26), correlacionando os micro-organismos mais próximos pela similaridade que estão depositadas no *Genbank*.

As árvores filogenéticas obtidas pelas análises de agrupamentos com os *primers* ITS1 e ITS4 selecionados evidenciou a proximidade genética entre as espécies avaliadas e as sequências do *Genbank*. Os dados obtidos através da análise morfológica e dos sequenciamentos estão em concordância.

Tabela 4 - Número de pares de base, homologia e similaridade entre os isolados e os gêneros depositados no banco de dados *Genbank*

Linhagens dos fungos / pares de base	Homologia	Similaridade (%)
<i>Aspergillus niger</i>		
URM 7748 (572 pb)	<i>Aspergillus niger</i> KP940589.1	100%
	<i>Aspergillus tubingensis</i> KF435033.1	100%
	<i>Aspergillus niger</i> MG759551.1	100%
URM 7749 (593 pb)	<i>Aspergillus niger</i> KP940589.1	100%
	<i>Aspergillus tubingensis</i> KF435033.1	100%
	<i>Aspergillus niger</i> MG759551.1	100%
URM 7750 (548 pb)	<i>Aspergillus niger</i> KP940589.1	100%
	<i>Aspergillus tubingensis</i> KF435033.1	99%
	<i>Aspergillus niger</i> MG759551.1	100%
URM 7809	Apenas taxonomia clássica	-
URM 7812 (687 pb)	<i>Aspergillus niger</i> KP940589.1	99%
	<i>Aspergillus tubingensis</i> KF435033.1	99%
	<i>Aspergillus</i> sp. KP881422.1	99%
URM 7813 (566 pb)	<i>Aspergillus niger</i> KP940589.1	100%
	<i>Aspergillus tubingensis</i> KF435033.1	100%
	<i>Aspergillus niger</i> MG759551.1	100%
URM 7815	Apenas taxonomia clássica	-
<i>Aspergillus nidulans</i>		
	<i>Aspergillus caespitosus</i> EF550973.1	99%
URM 7810 (531 pb)	<i>Aspergillus nidulans</i> JN676111.1	99%
	<i>Aspergillus nidulans</i> KU743895.1	99%
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
URM 7811	Apenas taxonomia clássica	-
URM 7734 (695 pb)	<i>Aspergillus fumigatus</i> KF305755.1	99%
	<i>Aspergillus oerlinghausenensis</i> NR_138362.1	99%
URM 7735 (620 pb)	<i>Aspergillus fumigatus</i> KT266801.1	100%
	<i>Aspergillus fumigatus</i> KF305755.1	100%

	<i>Aspergillus fumigatus</i> KF305755.1	98%
URM 7736 (652 pb)	<i>Aspergillus fumigatus</i> KT266801.1	99%
	<i>Aspergillus viridinutans</i> HM473077.1	99%
URM 7816	Apenas taxonomia clássica	-
URM 7817 (608 pb)	<i>Aspergillus fumigatus</i> KF305755.1	99%
	<i>Aspergillus oerlinghausenensis</i>	99%
	NR_138362.1	
URM 7818 (593 pb)	<i>Aspergillus fumigatus</i> KT266801.1	100%
	<i>Aspergillus fumigatus</i> KF305755.1	100%
	<i>Aspergillus terreus</i>	
	<i>Aspergillus terreus</i> KU319439.1	100%
URM 7731 (558 pb)	<i>Aspergillus hortai</i> FR837962.1	100%
	<i>Aspergillus terreus</i> MG250398.1	100%
URM 7733 (589 pb)	<i>Aspergillus terreus</i> KU319439.1	100%
	<i>Aspergillus hortai</i> FR837962.1	99%
URM 7741 (583 pb)	<i>Aspergillus terreus</i> KU319439.1	100%
	<i>Aspergillus terreus</i> MG250398.1	100%
	<i>Aspergillus terreus</i> KU319439.1	100%
URM 7742 (571 pb)	<i>Aspergillus terreus</i> MG250398.1	100%
	<i>Aspergillus hortai</i> FR837962.1	99%
URM 7743 (604 pb)	<i>Aspergillus terreus</i> KU319439.1	100%
	<i>Aspergillus hortai</i> FR837962.1	100%
URM 7744 (604 pb)	<i>Aspergillus terreus</i> MG250398.1	100%
	<i>Aspergillus terreus</i> KU319439.1	100%
URM 7814	Apenas taxonomia clássica	-
	<i>Aspergillus fischeri</i>	
	<i>Aspergillus fischeri</i> NR_137479.1	100%
URM 7737 (552 pb)	<i>Aspergillus oerlinghausensis</i>	99%
	KT359601.1	
	<i>Neosartorya fischeri</i> AY373895.1	99%
	<i>Aspergillus fischeri</i> NR_137479.1	100%
URM 7738 563 pb)	<i>Neosartorya fischeri</i> AY373895.1	100%

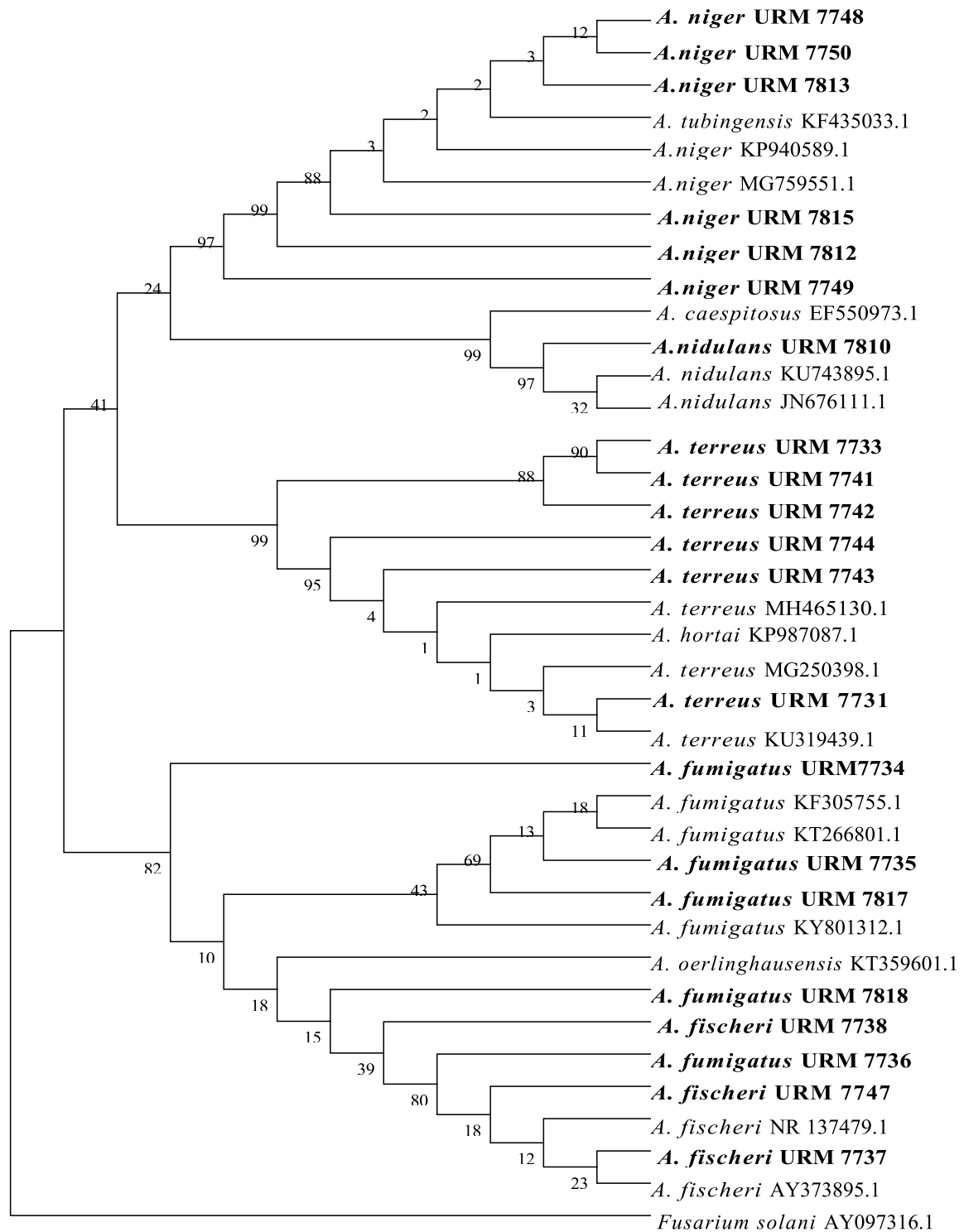
URM 7747 (617 pb)	<i>Aspergillus oerlinghausensis</i>	99%
	KT359601.1	
	<i>Neosartorya fischeri</i> AY373895.1	100%
	<i>Paecilomyces variotii</i>	
URM 7739 (516 pb)	<i>Paecilomyces variotii</i> FJ895878.1	99%
	<i>Paecilomyces formosus</i> KT899889.1	99%
URM 7740 (561 pb)	<i>Paecilomyces variotii</i> FJ895878.1	99%
	<i>Paecilomyces formosus</i> KT899889.1	99%
URM 7745 (557 pb)	<i>Paecilomyces variotii</i> FJ895878.1	99%
	<i>Paecilomyces formosus</i> KC157764.1	99%
URM 7746 (547 pb)	<i>Paecilomyces variotii</i> FJ895878.1	99%
	<i>Paecilomyces formosus</i> KC157764.1	99%

pb: pares de base

A região ITS do rDNA dos fungos é reconhecida como o “código de barras DNA” oficial por ser o marcador mais frequentemente sequenciado em tais micro-organismos, além de envolver *primers* que podem sequenciar praticamente qualquer DNA fúngico (IRINYI et al., 2015; GAUTIER et al., 2016). Portanto, esta região tem sido utilizada em identificações de rotina, pois é relativamente fácil de amplificar e sequenciar e mostra boa variação interespecífica (BRUN et al., 2013).

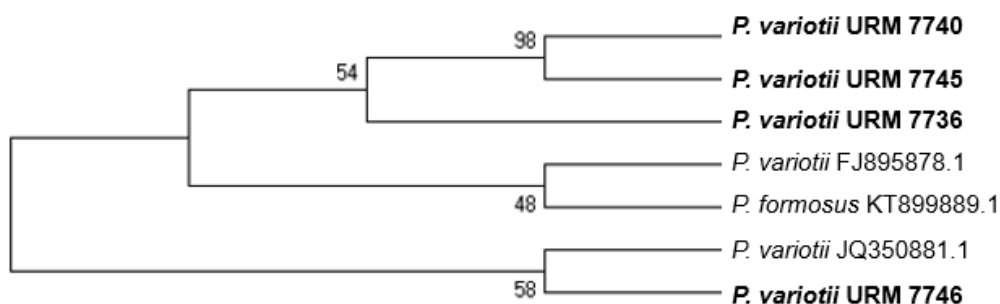
A região ITS não é variável o suficiente para distinguir algumas espécies de *Aspergillus* intimamente relacionadas. Conforme apresentado na Figura 11, todos os isolados de *A. fischeri* e *A. fumigatus* estão no mesmo clado. Segundo Samson et al. (2014), essas espécies formam um clado bem suportado (98% de valor de *bootstrap* - bs) indicando a estreita relação entre elas. Além disso, eles foram colocados juntos em um ramo com suporte estatístico moderado (77% bs), indicando que o *Aspergillus* é monofilético. Segundo Siqueira et al., (2016), este fato ocorre devido à relativa incapacidade de diferenciar espécies afins, portanto, estas espécies de *Aspergillus* são reconhecidas como indistinguíveis com base na sequência da região ITS. Neste estudo, a diferenciação dessas espécies foi alcançada usando tanto a identificação morfológica (Tabelas 2 e 3) quanto os perfis de restrição, cujos dados são mostrados adiante (Tabela 5). Nenhum deles obteve o mesmo perfil de digestão, provando que são espécies diferentes.

Figura 25 - Árvore filogenética 'Neighbour-Joining' gerada a partir de fragmentos obtidos da região ITS rDNA de espécies de *Aspergillus* isoladas de um coqueiral, em relação a micro-organismos depositados no *GenBank*



Fonte: O autor

Figura 26 - Árvore filogenética 'Neighbour-Joining' gerada a partir de fragmentos obtidos da região ITS rDNA de espécies de *Paecilomyces* isoladas de um coqueiral, em relação a micro-organismos depositados no *GenBank*



Fonte: O autor

Embora as estruturas morfológicas observadas em microcultivo em lâmina sejam extremamente úteis para a identificação de micro-organismos, como foi observado neste estudo, é muito difícil obter uma distinção intra-espécies por este método. Várias técnicas alternativas têm sido utilizadas para este fim. Entre as abordagens moleculares empregadas para decifrar a taxonomia de fungos, o Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) tem sido utilizado nas identificações intra-espécies (KIZIS et al., 2014). Esta técnica é aplicada em estudos genéticos, mapeamento molecular e programas de melhoramento genético (ROSTAMI et al., 2015).

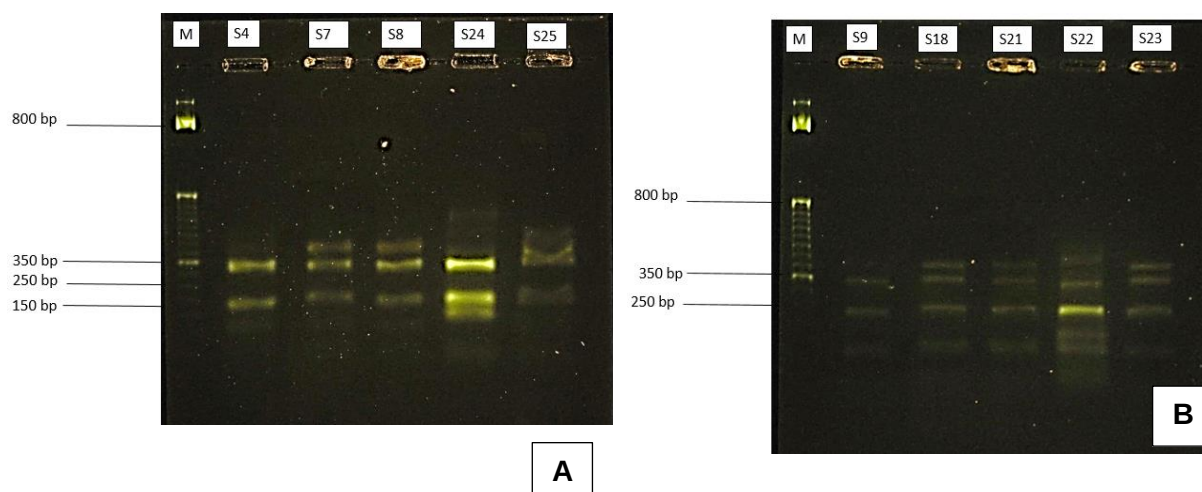
A caracterização intra-espécies dos fungos isolados neste trabalho foi realizada utilizando a técnica PCR-RFLP. Os produtos de PCR dos 30 fungos foram digeridos pelas enzimas de restrição *HhaI* e *MwoI*, que criaram diferentes perfis de digestão para cada isolado. Os tamanhos dos fragmentos gerados após a digestão enzimática são apresentados na Tabela 5. A Figura 27 (A e B) ilustra os fragmentos gerados após digestão dos produtos de PCR de alguns fungos.

MwoI e *HhaI* foram selecionadas como as melhores enzimas para diferenciação das 30 espécies isoladas neste estudo. Ambas foram escolhidas mediante: 1) avaliação minuciosa da literatura e 2) determinação de perfis de restrição teóricos das enzimas utilizando o programa *WebCutter* 2.0, disponível online (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Assim, tais enzimas foram escolhidas por apresentar padrões de corte diferenciais para a identificação das espécies. Os resultados demonstram que esta metodologia foi eficaz para a diferenciação intra-espécie dos isolados aqui identificados.

Tabela 5 - Tamanhos dos fragmentos (pb) dos produtos de PCR após digestão pelas enzimas *HhaI* e *MwoI* para espécies de *Aspergillus* e *Paecilomyces*

Espécies	Linhagens	Tamanho dos cortes (pb) dos produtos de PCR após digestão	
		<i>HhaI</i>	<i>MwoI</i>
<i>Aspergillus niger</i>	URM 7809	220; 50	220; 150
	URM 7748 e URM 7812	220; 190	220
	URM 7749	360; 220; 50	360; 220
	URM 7815	210; 180; 130	220
	URM 7813 e URM 7750	200	210; 180; 130
<i>Aspergillus fumigatus</i>	URM 7811	350; 180; 100	220
	URM 7734	210; 200	220
	URM 7735 e URM 7736	450; 350; 180	220
	URM 7816 e URM 7817	350; 200; 180; 50	450; 220
<i>Aspergillus terreus</i>	URM 7818	330; 150	380; 50
	URM 7731	320; 200	350; 200; 150
	URM 7814	100	180
	URM 7741 e URM 7742	380; 350; 200	400; 350; 250; 180
	URM 7733	350; 200; 180	420; 350; 200
<i>Aspergillus fischeri</i>	URM 7743 e URM 7744	330; 180	280
	URM 7737	350; 280	330; 210; 180
	URM 7738	150	200; 100
	URM 7747	150	340
<i>Paecilomyces variotii</i>	URM 7739	400; 180; 150	430; 180
	URM 7740	180; 150; 50	200; 100
	URM 7745 e URM 7746	230; 190; 100	100

Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR ITS1-IT4 de espécies de *Aspergillus* após digestão enzimática. A) Digestão enzimática dos produtos de PCR de URM 7811 (S4), URM 7735 (S7), URM 7736 (S8), URM 7816 (S24) e URM 7817 (S25) com *HhaI*. B) Digestão enzimática dos produtos de PCR de URM 7731 (S9), URM 7732 (S18), URM 7741 (S21), URM 7733 (S22) e URM 7742 (S23) com *MwoI*. M: Marcador DNA Ladder 100 bp



Fonte: O autor

Fragmentos de DNA medindo entre 50 pares de base (pb) a 450 pb para ambas as enzimas geraram perfis de digestão para cada isolado, os quais foram úteis para distingui-los intraespecificamente. *A. niger* URM 7748 e URM 7812, *A. niger* URM 7813 e URM 7750, *A. fumigatus* URM 7735 e URM 7736, *A. fumigatus* URM 7816 e URM 7817, *A. terreus* URM 7741 e URM 7742, *A. terreus* URM 7743 e URM 7744 apresentaram os mesmos perfis de restrição para ambas as enzimas, o que significa que são iguais entre si. A combinação de duas endonucleases permitiu a geração de todos os perfis de restrição, mas *HhaI* permitiu distinguir *A. niger* URM 7748 e *A. niger* URM 7812 de *A. niger* URM 7815, e *A. fumigatus* URM 7811 de *A. fumigatus* URM 7734 e de *A. fumigatus* URM 7735 / *A. fumigatus* URM 7736. *MwoI* foi útil principalmente para distinguir *A. fischeri* URM 7738 de *A. fischeri* URM 7747.

Estudos recentes envolvendo técnicas moleculares frequentemente resultam na identificação de numerosas populações dentro de muitas das espécies que são filogeneticamente distintas. No entanto, estas espécies distinguem-se por características moleculares (JUDOVA et al., 2012), pois caracteres macro e micromorfológicos geralmente não são evidentes ou suficientes para o processo de distinção. Entre as abordagens moleculares usadas para decifrar a taxonomia de *Aspergillus*, a PCR-RFLP tem sido usada com sucesso para identificar esta espécie

(KIZIS et al., 2014). Usando PCR-RFLP, variações na sequência de DNA podem ser detectadas, o que pode tanto detectar pequenas variações de nucleotídeos, que podem não ser expressas em nível de proteína, e detectar mudanças em regiões não-codificantes de DNA (EL- KHOURY et al., 2011).

Poucos estudos foram realizados utilizando PCR-RFLP para identificar fungos do gênero *Aspergillus* em nível de espécies (DIBA et al., 2014), o que também é válido para espécies de *Paecilomyces* pois, de acordo com Ebrahimi et al. (2015), há poucas informações disponíveis sobre a caracterização molecular de *P. variotii* e outras espécies do gênero.

Existe uma variabilidade suficiente na região do rDNA que pode servir como alvo para identificação dos isolados de *Aspergillus* utilizando PCR-RFLP e as sub-regiões ITS1-ITS2 foram reveladas como marcadores para a discriminação entre espécies através da digestão com enzimas específicas (DIBA et al., 2014). Alguns estudos obtiveram resultados promissores com a digestão enzimática utilizando *MwoI* e *HhaI*, pois foi possível realizar a diferenciação intra-espécies de *Aspergillus* por meio da PCR-RFLP (MIRHENDI et al., 2007; DIBA et al., 2014; KIZIS et al., 2014; NASRI et al., 2015; MIRHENDI et al., 2016).

Com relação à espécie *P. variotii*, apenas um estudo utilizando PCR-RFLP e enzimas de restrição para determinar a diversidade genética de 20 isolados da espécie foi encontrado na literatura. Em seu trabalho, Rostami et al (2015) utilizaram 4 enzimas (*EcoRI*, *MspI*, *MseI* e *MboI*) e, como resultado, concluíram que os isolados pertencem à mesma linhagem. Portanto, o presente estudo traz o primeiro relato sobre PCR-RFLP da referida espécie utilizando as enzimas *MwoI* e *HhaI*.

No entanto, com relação à PCR-RFLP, alguns problemas foram relatados. DIBA et al. (2014), utilizando a enzima de restrição *MwoI* nas regiões ITS do rDNA, desenvolveu um método para a identificação de várias espécies de *Aspergillus* clinicamente importantes incluindo *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. ochraceus* e *A. amstelodami*. Mas, devido à proximidade dos tamanhos dos fragmentos, alguns perfis ficaram complicados de delinear. Ademais, os perfis de restrição de *A. fumigatus*, *A. clavatus* e *Neosartorya fischeri* foram semelhantes e, portanto, a diferenciação não pôde ser feita.

Com relação aos testes de atividade antimicrobiana realizados neste trabalho, dos 30 fungos avaliados, 14 (46,67%) apresentaram potencial antimicrobiano frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) e/ou *K. pneumoniae* (UFPEDA-396). As médias aritméticas

dos halos de inibição encontrados no ensaio primário (bloco de gelose) são apresentadas a seguir, na Tabela 6.

Tabela 6 - Média aritmética dos halos de inibição (mm) dos isolados frente a micro-organismos de interesse clínico, utilizando a metodologia do bloco de gelose

Fungos filamentosos	Médias aritméticas - halos de inibição (mm)			
	<i>S. aureus</i> UFPEDA-02	Desvio padrão	<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA-396	Desvio padrão
<i>A. fumigatus</i> URM 7811	16,0	-	13,5	±0,5
<i>A. fumigatus</i> URM 7735	16,5	±0,5	12,5	±0,5
<i>A. fumigatus</i> URM 7736	17,0	0	12,0	0
<i>A. fumigatus</i> URM 7816	16,5	±0,5	-	-
<i>A. fumigatus</i> URM 7817	15,5	±0,5	11,5	±0,5
<i>A. fumigatus</i> URM 7818	15,5	±0,5	12,5	±0,5
<i>A. terreus</i> URM 7731	12,5	±0,5	14,0	±2,0
<i>A. terreus</i> URM 7814	-	-	11,0	0
<i>A. terreus</i> URM 7732	-	-	11,0	0
<i>A. terreus</i> URM 7741	11,5	±0,5	11,0	±1,0
<i>A. terreus</i> URM 7733	11,0	0	-	-
<i>A. terreus</i> URM 7743	11,0	±0,5	14,5	±1,5
<i>A. fischeri</i> URM 7738	13,0	±1,0	-	-
<i>A. fischeri</i> URM 7747	15,0	0	11,5	±0,5

(-) não houve halo de inibição

Como é possível observar na Tabela 6, nenhum dos 30 isolados apresentou inibição frente às cepas de *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Os isolados das espécies *A. nidulans* e *A. niger* não promoveram inibição do crescimento dos isolados clínicos testados sobre essas condições. Porém, há relatos que comprovam o potencial antimicrobiano de *A. nidulans* frente a *Escherichia coli* e *S. aureus* (ZHANG et al., 2015). Outro estudo afirma que tal fungo é produtor de penicilina (HERR e FISCHER, 2014). De acordo com Al-Shaibani et al. (2013), *A. niger* é um dos melhores micro-organismos do ponto de vista farmacêutico, pois produz várias enzimas industrialmente importantes, bem como outros produtos e, com relação à atividade antimicrobiana, produz compostos antimicrobianos como ácido tensiuico, nigerazina

B e tensidol A. Os resultados encontrados no presente estudo encontram-se em discordância com Al-Shaibani et al. (2013). No entanto, os mesmos autores afirmam que a produção de metabólitos secundários pode ser afetada pelo estágio de desenvolvimento do fungo e por fatores intrínsecos e extrínsecos do ambiente, como substrato disponível, pH, atividade da água, temperatura, luz e disponibilidade de oxigênio, o que pode justificar o fato de as 7 espécies de *A. niger* isoladas neste estudo não apresentarem atividade antimicrobiana contra os micro-organismos aqui testados.

De acordo com Balouiri et al. (2016), o método do bloco de gelose é frequentemente utilizado para realçar o antagonismo entre micro-organismos. Durante o seu crescimento, as células microbianas secretam moléculas que se difundem no meio, podendo impedir o crescimento do micro-organismo teste.

Analisando a Tabela 6, pode-se observar que os maiores halos de inibição frente a *S. aureus* foram apresentados pelos isolados da espécie *A. fumigatus*, variando de 15,5 a 17,0 mm. Frente a *K. pneumoniae*, o maior potencial de inibição foi apresentado pela espécie *A. terreus*, com halos entre 11,0 e 14,5 mm. *A. terreus* já possui potencial antimicrobiano comprovado frente a *S. aureus* e *C. neoformans* (IBRAHIM et al., 2015); *S. aureus* e *Enterobacter aerogenes* (WANG et al., 2011); *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Alternaria alternata* e *A. solani* (MOSTAFA et al., 2016). *A. fumigatus* também já foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana e demonstrou potencial frente a *S. aureus*, *C. albicans* e *Micrococcus luteus* (FURTADO et al., 2002); *S. aureus* e *E. coli* (JUDOVA et al., 2012) e *Malassezia furfur* (KANG et al., 2013).

A inibição apresentada pelas espécies deste trabalho encontra-se em concordância com a maioria das referências citadas acima, quando se trata de *S. aureus*. Porém, nenhum estudo sobre o potencial antimicrobiano de *A. terreus* e *A. fumigatus* frente a *K. pneumoniae* foi encontrado para estabelecer comparação com os resultados encontrados. Ademais, as diferenças aqui encontradas (não houve inibição frente a *C. albicans*, por exemplo) podem ser justificadas pelo motivo citado anteriormente, já que se tratam de cepas coletadas em lugares distintos e, portanto, são diferentes.

A partir dos resultados obtidos nesta etapa, os micro-organismos que apresentaram potencial antimicrobiano foram conduzidos ao cultivo em meio líquido e, posteriormente, ao teste de disco difusão. As médias aritméticas dos halos de inibição (mm) frente a *S. aureus* são apresentados a seguir, na Tabela 7.

Tabela 7 - Médias aritméticas dos halos de inibição (mm) de isolados frente a micro-organismos de interesse clínico, utilizando a metodologia de disco difusão

Fungos filamentosos	Médias aritméticas – Halos de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i> UFPEDA-02	Desvio padrão
<i>A. fumigatus</i> URM7735	13,0	±1,0
<i>A. fumigatus</i> URM 7736	11,5	±0,7
<i>A. fumigatus</i> URM 7817	11,0	±1,0
<i>A. terreus</i> URM 7731	22,0	±1,5
<i>A. terreus</i> URM 7732	14,0	±0,5
<i>A. terreus</i> URM 7741	14,0	±0,5
<i>A. terreus</i> URM 7733	18,0	±2,0
<i>A. terreus</i> URM 7743	15,0	±1,5

(-) não houve halo de inibição.

Nas condições testadas, nenhum fungo apresentou potencial antimicrobiano frente a *K. pneumoniae*, nem mesmo aqueles que foram capazes de inibir seu crescimento no ensaio primário. Esse fato pode ser justificado por se tratar de metodologias diferentes, pois no bloco de gelose o micro-organismo teste foi desafiado pelo fungo retirado diretamente do cultivo em ágar. Já no ensaio secundário, o teste foi realizado após cultivo em meio líquido; ou seja, os fungos foram submetidos a condições diferentes.

Constatou-se que, nas condições testadas, a zona de inibição apresentada pela linhagem *A. terreus* URM 7731 foi a maior (22,0 ±1,5 mm). Portanto, para as demais etapas realizadas neste estudo, utilizou-se este isolado. Conhecendo a importância de se encontrar novos compostos com propriedade antimicrobiana frente a micro-organismos resistentes às drogas que hoje estão disponíveis no mercado, foram acrescentados isolados clínicos de *S. aureus* multidrogas resistentes (MDR).

As infecções por bactérias multirresistentes representam um problema relevante de saúde pública, pois acomete diversos países e reflete risco à saúde e à segurança dos pacientes (SOUZA et al., 2015). A epidemiologia do MRSA está em constante mudança e tanto os clones circulantes como seus perfis de resistência a antibióticos variam consideravelmente, dependendo da região e do país (MEJIA et al., 2010). Os mesmos autores afirmam que, em muitos países, MRSA transformou-se

em patógeno nosocomial endêmico. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos informa que, em 2010, as infecções por MRSA representaram 63% das infecções causadas por *S. aureus* nos EUA; em 1974, eram apenas 2%, e 22% em 1995. Logo, surge a importância da busca por novos agentes antimicrobianos com potencial frente a estes micro-organismos.

Sendo assim, a fim de investigar a influência de diferentes condições de cultivo no potencial antimicrobiano de *A. terreus* URM 7731, inicialmente três parâmetros foram avaliados: crescimento celular, meio e tempo de cultivo. Nesta etapa, foi possível verificar que não houve halo de inibição para nenhum dos micro-organismos avaliados quando o fungo foi cultivado no Caldo Czapek modificado. Assim, os resultados da atividade antimicrobiana aqui apresentados dizem respeito ao cultivo do referido fungo em Extrato de Malte a 1,5% e em Caldo Batata. Os resultados dessa primeira etapa da avaliação das condições de cultivo estão dispostos abaixo, nas Figuras 28 (meio e tempo de cultivo), 29 (biomassa) e 30 (pH).

Através destes gráficos, pode-se observar que, nas condições testadas, os maiores halos de inibição foram encontrados durante as 96 horas de cultivo em Extrato de Malte (23,5 mm para UFPEDA-02; 22,0 mm para UFPEDA-699; 20,5 mm para UFPEDA-709; 20,0 mm para UFPEDA-718 e 19,5 mm para UFPEDA-731). Com relação ao cultivo em Caldo Batata, observa-se que a inibição das cepas só se inicia a partir de 72 horas de cultivo e, com exceção da cepa UFPEDA-731 (na qual o maior halo é encontrado em torno das 96 horas e mantém-se com o mesmo tamanho até as 120 horas), os maiores halos surgem em torno das 120 horas de cultivo. Zain et al. (2009) afirmam que os metabólitos secundários não são compostos essenciais para o crescimento do micro-organismo, nem intermediários chave do metabolismo básico do mesmo. Porém, desempenham outros papéis na vida dos fungos. Geralmente, são encontrados como uma mistura de moléculas estreitamente relacionadas. A produção de metabólitos secundários é susceptível à condição ambiental, ou seja, é restrita a certas condições.

Com relação ao crescimento celular, na Figura 28 ilustra-se as curvas de crescimento de *A. terreus* URM 7731 nos 3 meios em que foi cultivado. O meio Czapek é pobre em nutrientes, pois em sua composição possui apenas traços de sais. Neste trabalho, utilizou-se o meio Czapek modificado, proposto por Singh et al. (2015), os quais propõem a adição de sacarose ao meio. Na Figura 9, observa-se que *A. terreus* URM 7731 cresceu preferencialmente no referido meio, chegando a alcançar

aproximadamente $10,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa nos tempos 48 e 120 horas. Às 72 horas de cultivo, o crescimento cai subitamente e, depois, começa a se elevar. Este fato é comum quanto os componentes nutricionais do meio se esgotam, forçando o micro-organismo a encontrar uma maneira de continuar sobrevivendo mesmo com escassez de substrato. Porém, para este meio não houve atividade antimicrobiana. De acordo com Arora e Chandra (2010), uma espécie fúngica pode utilizar uma fonte particular de carbono para o crescimento vegetativo, mas pode não ser capaz de usá-la para a produção de moléculas estruturais especializadas. Assim, *A. terreus* URM 7731 utilizou os componentes do meio para crescimento, e não para produzir os metabólitos de interesse.

No meio BD, houve um crescimento intermediário em relação aos outros dois meios avaliados. Nesta condição, observa-se que a biomassa apresenta-se maior durante as 96 horas de cultivo ($5,7 \text{ g.L}^{-1}$) e, depois disso, começa a decair. Provavelmente, este fato aconteceu pelo mesmo motivo explicado para CZ.

Com relação ao Extrato de Malte, meio em que houve a maior atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos teste, é notório que *A. terreus* URM 7731 cresceu muito menos nele do que nos demais meios, atingindo seu crescimento máximo ($3,08 \text{ g.L}^{-1}$) às 96 horas de cultivo. Depois, este crescimento começa a decair. Logo, pressupõe-se o micro-organismo desviou a rota de consumo dos nutrientes para a produção de metabólitos secundários.

Segundo Santos et al. (2013), os estudos da interação das fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo das diferentes linhagens são importantes na medida em que estes compostos apresentam uma complexidade estrutural e são fontes utilizadas pelos micro-organismos para um bom desempenho metabólico. O efeito da interação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio pode ser um fator importante para promover melhoria na eficiência fermentativa para os micro-organismos melhorarem a produção de metabólitos de interesse.

A biossíntese de metabólitos secundários é regulada pelos componentes dos meios de cultura como fontes de carbono, nitrogênio e outros fatores ambientais. Com relação aos componentes nutricionais que constituem os meios de cultivo utilizados no presente trabalho, nota-se que três fontes de carbono foram avaliadas: maltose (Extrato de Malte), glicose (Caldo Batata) e sacarose (Czapek).

Figura 28 - Gráficos dos halos de inibição (mm) produzidos por *Aspergillus terreus* URM 7731 frente a cepas de *S. aureus* padrão (UFPEDA-02) e MDR (UFPEDA-699, UFPEDA-709, UFPEDA-718, UFPEDA-731)

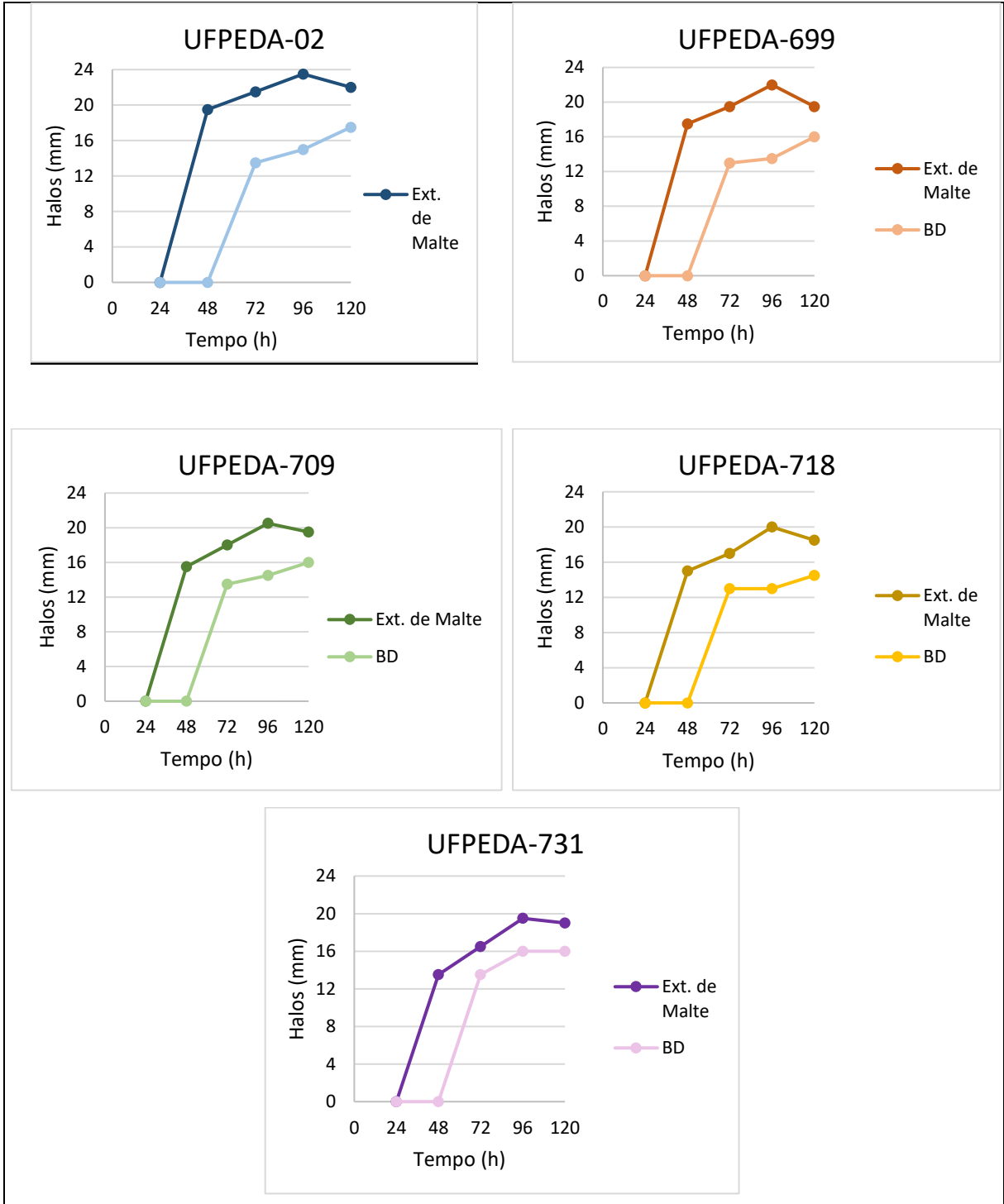
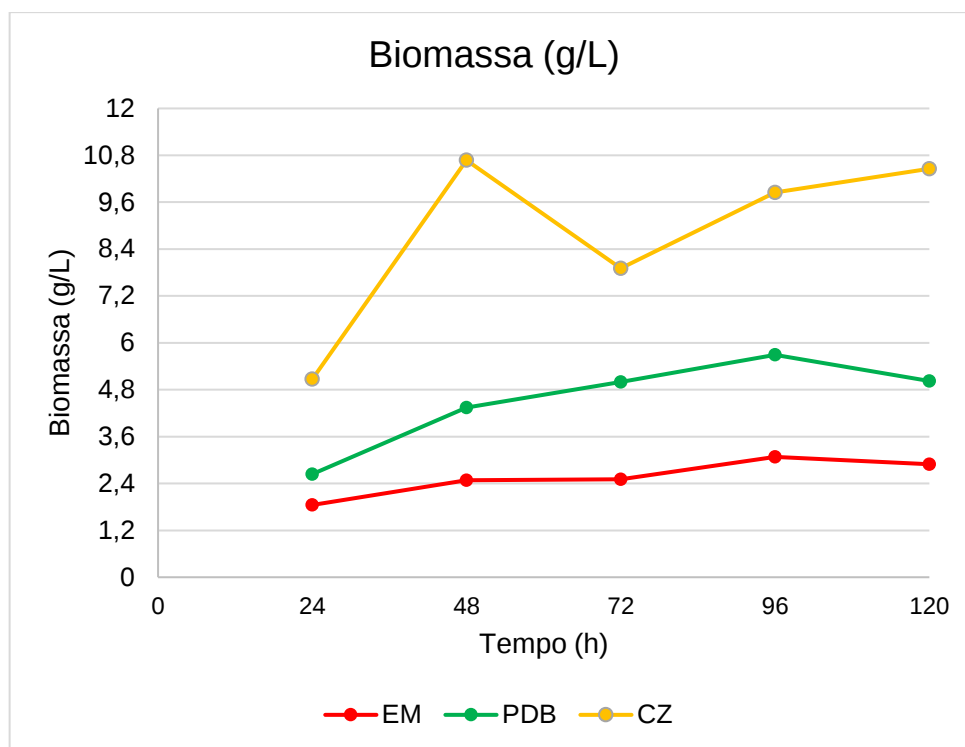


Figura 29 - Curvas de crescimento (g.L^{-1}) de *Aspergillus terreus* URM 7731 em Caldo Czapek (CZ), Caldo Batata (BD) e Extrato de Malte em cultivo submerso, a 150 rpm, 30 °C, durante 120 horas



Fonte: O autor

A fonte de carbono pode, muitas vezes, limitar o crescimento dos micro-organismos. Segundo Gasong e Tjandrawinata (2016), há uma maior concentração de fonte de carbono em Caldo Batata do que em Caldo Extrato de Malte. Santos et al. (2013), ao compararem a utilização de glicose e sacarose em um processo fermentativo, encontraram que houve maior produção de biomassa no meio com sacarose. Peyer et al. (2016) encontraram que a maltose foi a fonte de carbono preferida utilizada em um processo fermentativo, seguido da glicose. Logo, estes resultados estão em concordância com o que foi encontrado no presente trabalho. Assim, diante das informações aqui citadas, pressupõe-se que a sacarose foi o carboidrato melhor associado ao crescimento do isolado *A. terreus* URM 7731, seguida pela glicose e pela maltose.

O meio em que houve maior crescimento celular, CZ modificado, possui duas fontes de nitrogênio: uma complexa (extrato de levedura) e outra convencional (NaNO_3). O Extrato de Malte também é tratado como fonte de nitrogênio (CELESTINO et al., 2014). O nitrogênio é essencial para formar os aminoácidos e,

consequentemente, as proteínas; não é tão importante quanto a fonte de carbono na limitação do desenvolvimento microbiano, mas é essencial para a produção de antibióticos.

Logo, observando-se que o cultivo em Extrato de Malte apresentou melhores resultados, as etapas subsequentes foram realizadas utilizando o meio Extrato de Malte a 1,5% e os cultivos foram sempre interrompidos após 96 horas do seu início, pois foi durante este período que o fungo produziu maior quantidade do metabólito de interesse.

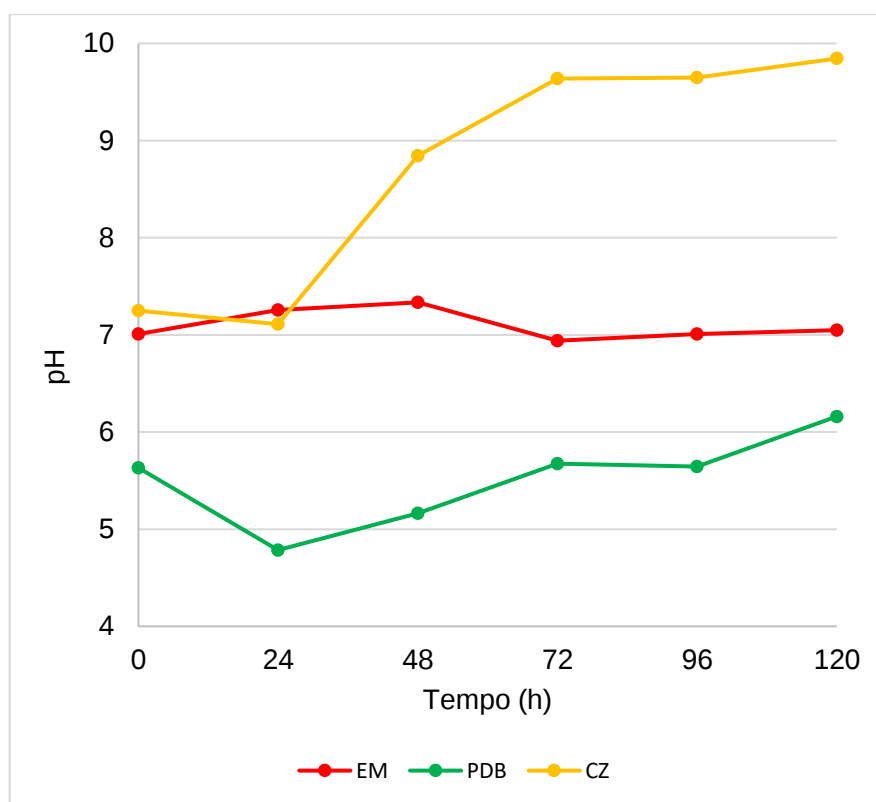
Ibrahim et al. (2015) conseguiram isolar, a partir do cultivo de uma cepa de *A. terreus*, dois compostos com propriedade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *C. neoformans*. Porém, tais autores utilizaram fermentação sólida com resíduos agroindustriais e não otimizaram as condições de cultivo do referido fungo. Mostafa et al. (2016) obtiveram resultados de inibição utilizando *A. terreus* contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. alternata* e *A. solani*; porém, o processo utilizado também foi a fermentação sólida, sem otimização das condições de cultivo. Tal fato pode justificar porque a cepa avaliada neste estudo não inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* e *C. albicans*, pois as condições oferecidas para cultivo de *A. terreus* URM 7731 foram bastante distintas das que foram utilizadas pelos estudos acima citados.

Durante o acompanhamento do pH, notou-se perfis variados nos resultados obtidos pelos 3 meios de cultivo. A cada 24 horas, o pH foi medido e os resultados foram plotados em um gráfico, o qual é exposto na Figura 30.

No cultivo de Extrato de Malte, observa-se uma discreta acidificação após 48 horas de cultivo, a qual geralmente ocorre pela produção de ácidos orgânicos. Para CZ, o pH inicial (equivalente a 7,25) teve um aumento significativo a partir das primeiras 24 horas de cultivo, chegando a atingir aproximadamente 10,0 até as 120 horas. O contrário é observado para BD, no qual ocorreu uma acidificação nas primeiras 24 horas.

Sabe-se que na ausência de meio tamponado, o valor do pH cai durante as primeiras fases de fermentação e este fenômeno pode ser tido como um reflexo da atividade do fungo, que está absorvendo aminoácidos, acumulando íons, excretando gás carbônico no meio ou mesmo excretando íons H^+ durante a geração de ATP pela respiração (DE MORAIS, 1984).

Figura 30 - Representação das curvas de pH dos cultivos de *Aspergillus terreus* URM 7731 em Caldo Czapek (CZ), Caldo Batata (BD) e Extrato de Malte em cultivo submerso, a 150 rpm, 30 °C, durante 120 horas

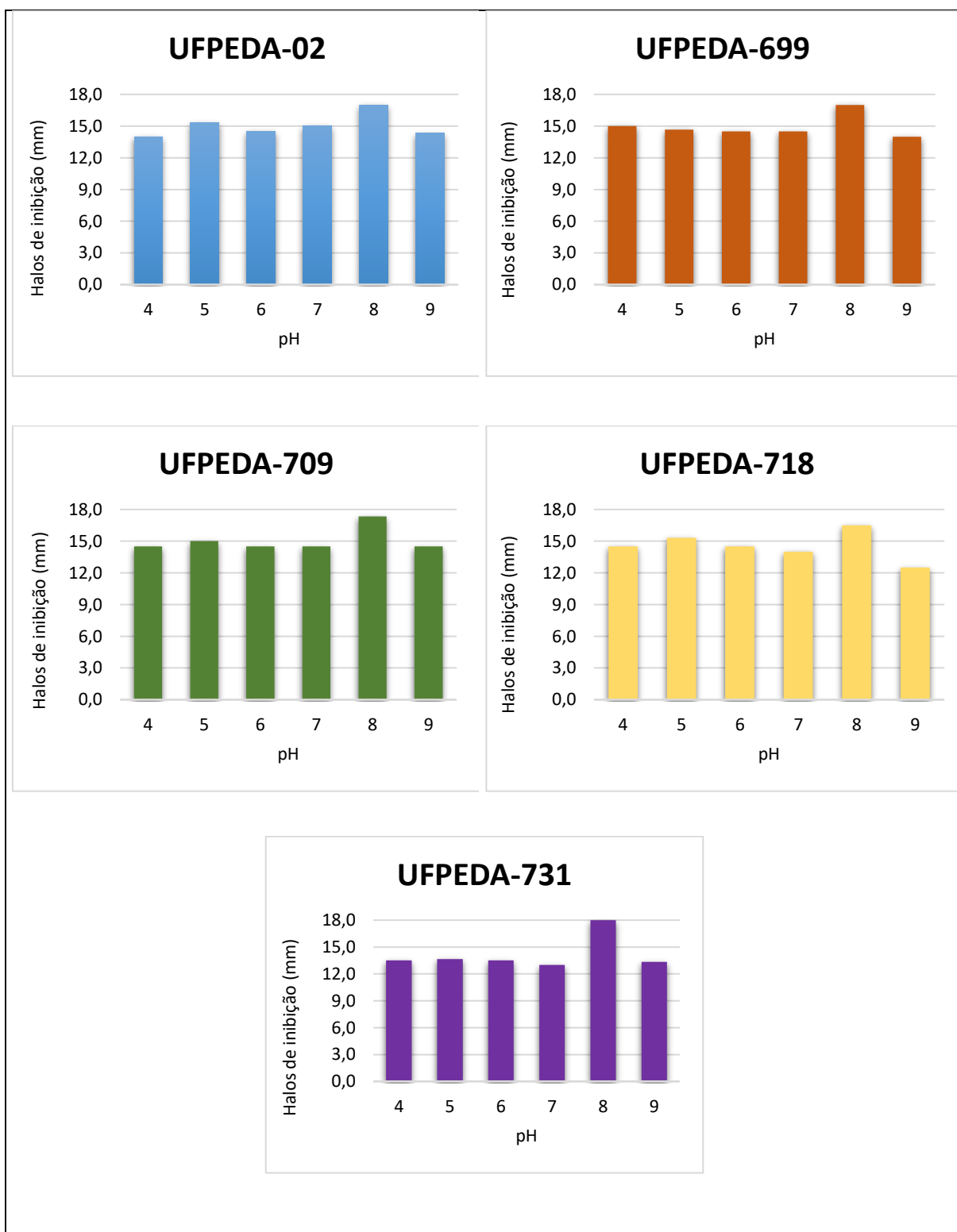


Fonte: O autor

Porém, em cultivos com fonte de nitrogênio, que leva à formação de amônia no meio de cultivo, o pH também determina a forma em que esta substância se apresenta. Por exemplo, em pH acima de 11,0, o nitrogênio encontra-se na forma não-protonada de amônia, que é a forma que tem passagem livre pela membrana celular e talvez isso justifique uma melhor assimilação do nitrogênio pelo fungo, no caso do cultivo em CZ (BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

Por fim, realizou-se novos cultivos variando o pH do meio, a fim de constatar se tal parâmetro influencia no potencial de inibição do referido fungo frente aos micro-organismos de interesse clínico. Foram avaliados 6 diferentes pH, os quais variaram de 4,0 a 9,0. Os resultados obtidos nesta etapa estão expostos na Figura 31.

Figura 31 - Representação (em barras) do cultivo de *Aspergillus terreus* URM 7731 em Extrato de Malte a 1,5%, utilizando diferentes pH, a 150 rpm, 30 °C, durante 96 horas, frente a linhagens de *Staphylococcus aureus*



Fonte: O autor

O pH do caldo de cultivo é um dos parâmetros mais críticos que afetam o crescimento e a biossíntese de metabólitos, e que varia entre diferentes organismos, condições operacionais e meios de cultivo utilizados (LACROIX et al., 1985; YANG; LIAU, 1998). Mudanças no valor intracelular do pH são indesejáveis. Isso justifica a eficiente capacidade tamponante intracelular que os micro-organismos possuem, sendo capazes de manter o valor de pH sempre ótimo (NEVES, 2013).

Como se pode observar na Figura 31, os halos de inibição foram maiores para o caldo fermentado com pH=8,0 (UFPEDA-02: 17,0 mm; UFPEDA-699: 17,0 mm; UFPEDA-709: 17,3 mm; UFPEDA-718: 16,5 mm; UFPEDA-731: 18,0 mm). Logo, para atividade antimicrobiana, é mais interessante que os cultivos sejam realizados com o pH do meio ajustado para 8,0 antes que o mesmo seja inoculado.

A avaliação das condições de cultivo é útil para o desenvolvimento de um bioprocessamento sustentável, pois é possível aumentar o rendimento de um metabólito, reduzir a duração do tempo de cultivo, minimizar custos e maximizar a produção (CARVALHO et al. 2008; VENUGOPALAN e SRIVASTAVA, 2015). Assim, de acordo com as condições avaliadas, os cultivos seguintes passaram a ser realizados com o isolado *A. terreus* URM 7731, em Extrato de Malte a 1,5%, com o pH ajustado para 8,0, durante 96 horas.

Na etapa subsequente, buscou-se determinar qual o solvente orgânico que melhor extraía os metabólitos de interesse presentes no líquido metabólico. Para tanto, o volume final obtido deste líquido, previamente separado da biomassa por filtração a vácuo, foi dividido em 3 partes iguais, sendo que cada uma foi extraída por um solvente: hexano, diclorometano e acetato de etila. Depois de rotaevaporados, os extratos (EBHex, EBDic e EBACOEt) foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano. Os resultados desse teste são representados a seguir, na Tabela 8.

O solvente orgânico que melhor extraiu o metabólito de interesse do líquido metabólico foi o diclorometano, tendo em vista que os menores valores de CIM foram obtidos pelo EBDic. Para a cepa *S. aureus* UFPEDA-02, a CIM do EBDic foi 32 vezes menor que a do EBHex e 4 vezes menor que a do EBACOEt. Contra os isolados clínicos MDR, o EBHex não teve atividade nas condições testadas, ao passo que a CIM do EBDic foi de 500 µg/mL para todos os isolados e para EBACOEt teve CIM de 500 µg/mL para os isolados UFPEDA-699, 709 e 731 e de 1000 µg/mL para UFPEDA-718. Vale ressaltar que, neste caso, os valores de CIM e CMB coincidiram. Assim, novos cultivos submersos foram realizados, afim de se obter grandes volumes de

líquido metabólico para extrair utilizando diclorometano. Estes extratos foram rotaevaporados e armazenados a 4 °C para que outros testes de atividade biológica fossem realizados.

Tabela 8 - CIM e CMB dos extratos obtidos a partir da extração do líquido metabólico com solventes orgânicos: Hexano (EBHex), Diclorometano (EBDic) e Acetato de Etila (EBAcOEt)

Micro-organismos	CIM/CMB - Extratos (µg/mL)		
	EBHex	EBDic	EBAcOEt
<i>S. aureus</i> UFPEDA-02	1000 µg/mL	31,25 µg/mL	125 µg/mL
<i>S. aureus</i> UFPEDA-699	< 1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL
<i>S. aureus</i> UFPEDA-709	< 1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL
<i>S. aureus</i> UFPEDA-718	< 1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
<i>S. aureus</i> UFPEDA-731	< 1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL

Em laboratórios de pesquisa, extrações com solvente são necessárias e bastante utilizadas. Diclorometano (ou cloreto de metileno, CH₂Cl₂) é um hidrocarboneto alifático incolor, halogenado, com um odor doce, suave, semelhante ao odor do éter. Foi largamente utilizado na indústria farmacêutica, bem como na extração para alguns componentes de alimentos. Em laboratórios de pesquisa, é conhecido como um bom solvente e usado como tal, porém o seu uso exige cuidados, apesar da sua baixa toxicidade aguda (CAYOT et al., 2016).

Extrações de metabólitos secundários utilizando solventes orgânicos de polaridades distintas, com efeito comparativo, são mais comuns em estudos com plantas do que com micro-organismos. Ademais, investigações utilizando diclorometano como solvente extrativo também são mais comuns com espécies vegetais (DIRAR et al., 2019; AFOUXENIDI et al., 2018; GÓMEZ-BETANCUR et al., 2015). Porém, Fernand et al. (2017) isolaram uma linhagem de *Aspergillus niger* de camarões coletados no ambiente marinho, a qual foi cultivada sob fermentação submersa, sendo o caldo fermentado foi extraído utilizando um sistema formado por acetato de etila e diclorometano (1:1, v/v). Contudo, estes autores não investigaram atividades biológicas para estes compostos. Khebizi et al. (2018) isolaram dois compostos com atividade antifúngica, oriundos do extrato obtido após extração do

caldo fermentado por uma linhagem de *Streptomyces sp.*, utilizando diclorometano (1:1, v/v).

É comum encontrar estudos que buscam extrair metabólitos secundários produzidos por micro-organismos, porém, a maioria dos autores procedem com a extração utilizando apenas acetato de etila, sem investigar o poder extrativo de outros solventes, ao contrário do que foi realizado no presente trabalho. Por exemplo, Elissawy et al. (2019) isolaram uma linhagem de *Aspergillus sp.* oriundo de um mangue, cultivaram-na sob fermentação sólida e, posteriormente, procederam a extração exaustiva utilizando acetato de etila, sendo que os compostos isolados foram investigados quanto ao potencial antioxidante. Liu et al. (2018) isolaram uma linhagem de *A. terreus* do ambiente marinho, a qual foi submetida a fermentação sólida e, posteriormente, realizou-se uma extração utilizando acetato de etila. Tais autores conseguiram isolar 12 compostos, os quais foram avaliados quanto aos potenciais antimicrobiano e antioxidante. Sun et al. (2018) isolaram, utilizando acetato de etila como solvente extrativo, compostos com atividade antioxidante produzidos por *A. luchuensis*. Rajamanikyam et al. (2017) também utilizaram acetato de etila (1:1, v/v), a fim de extrair metabólitos secundários a partir do caldo fermentado oriundo do cultivo de *A. allahabadii*. Os dois compostos extraídos e identificados (maltol e ácido kójico) foram investigados quanto aos potenciais antimicrobiano, antioxidante, larvicida e antidiabético.

Alkhulaifi et al. (2018) isolaram 7 linhagens de fungos filamentosos (5 *Aspergillus spp.* e 2 *Fusarium spp.*), sendo duas delas *A. terreus*. Após realizar cultivos submersos, os caldos fermentados foram extraídos utilizando n-butanol, solvente orgânico mais polar que acetato de etila e diclorometano. O solvente foi rotaevaporado e os extratos foram utilizados para investigar o potencial antimicrobiano dos fungos, através de um *screening*. Al-Enazi et al. (2017) fizeram um estudo semelhante, isolando fungos do solo e submetendo-os a cultivos submersos, cujos caldos fermentados também foram extraídos com n-butanol; neste caso, os autores investigaram o potencial anti-*Candida* dos fungos isolados.

Para avaliar se EBDic é capaz de diminuir a CIM de antibióticos utilizados na prática clínica frente a cepas de *S. aureus*, utilizou-se o método do *checkerboard*. Antes de realizar as combinações antimicrobianas *in vitro* nas microplacas de 96 poços, os antibióticos utilizados neste teste foram selecionados após a realização de

um antibiograma, a fim de confirmar a sensibilidade/resistência das cepas MDR. Os resultados desta avaliação são apresentados a seguir, na Tabela 9.

Tabela 9 - Médias aritméticas (mm) dos halos de inibição produzidos por antibióticos frente a isolados de *Staphylococcus aureus*

Antibióticos	Médias aritméticas - halos de inibição (mm)				Padrão CLSI para <i>S. aureus</i> (2017); mm
	UFPEDA-699	UFPEDA-709	UFPEDA-718	UFPEDA-731	
Cefoxitina	30,0 mm ± 0	26,0 mm ± 0,0	26,5 mm ± 0,5	26,5 mm ± 0,5	R≤24; S≥25
Cloranfenicol	9,5 mm ± 0,5	8,0 mm ± 0,0	23,0 mm ± 1,0	8,0 mm ± 0,0	R≤12; S≥18
Clindamicina	0,0	0,0	27,0 mm ± 1,0	26,0 mm ± 0,0	R≤14; S≥21
Eritromicina	0,0	0,0	24,0 mm ± 1,0	24,4 mm ± 0,5	R≤13; S≥23
Gentamicina	0,0	0,0	18,0 mm ± 0,0	16,0 mm ± 0,0	R≤12; S≥15
Ciprofloxacina	0,0	0,0	0,0	11,5 mm ± 0,5	R≤15; S≥21
Oxacilina	20,5 mm ± 0,5	19,0 mm ± 0,0	24,0 mm ± 1,0	18,5 mm ± 0,5	R≤28; S≥29

Legenda: R: resistente; S: sensível

Comparando os halos de inibição obtidos com os valores considerados pelo CLSI (2017) para classificar um isolado de *S. aureus* sensível ou resistente à determinada droga, pode-se concluir que as cepas UFPEDA-699 e UFPEDA-709 são resistentes a 6 antibióticos, dentre os 7 testados, sendo sensíveis apenas a cefoxitina nas condições testadas. Por esse motivo, tais isolados foram selecionados para a determinação do sinergismo *in vitro* entre os agentes antimicrobianos e EBDic.

Previamente, buscou-se determinar a CIM dos antibióticos gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina e oxacilina por microdiluição em placa. Para ambas as linhagens, a CIM da eritromicina foi maior que 960 µg/mL e, segundo a CLSI (2017),

cepas de *Staphylococcus spp.* são consideradas resistentes a eritromicina quando a CIM é maior ou igual a 8 µg/mL. Assim, decidiu-se não utilizar este antibiótico para avaliação do sinergismo, diante do alto valor de CIM encontrado. Para a linhagem UFPEDA-699, realizou-se o *checkerboard* entre ciprofloxacina-EBDic e gentamicina-EBDic. Contudo, a CIM da gentamicina frente à linhagem UFPEDA-709 foi maior que 960 µg/mL, sendo que, de acordo a CLSI (2017), cepas de *Staphylococcus spp.* são consideradas resistentes a gentamicina quando a CIM é maior ou igual a 16 µg/mL. Assim, realizou-se a avaliação do sinergismo entre ciprofloxacina-EBDic e oxacilina-EBDic.

Os resultados mostraram que a combinação de antibióticos com o EBDic permitiu uma redução na CIM de diferentes drogas antimicrobianas sobre as cepas testadas. Com relação à cepa UFPEDA-699, foi possível observar que a associação entre EBDic e ciprofloxacina fez com que a CIM do antibiótico caísse pela metade (30 µg/mL isoladamente para 15 µg/mL em associação), enquanto que a CIM da gentamicina foi consideravelmente reduzida em 32 vezes (480 µg/mL isoladamente para 15 µg/mL, quando associado a EBDic). Em ambos os casos, a CIM do EBDic diminuiu em 8 vezes (500 µg/mL isoladamente para 62,5 µg/mL, quando associado aos antibióticos). Quanto ao isolado UFPEDA-709, a associação entre EBDic e ciprofloxacina fez com que a CIM do antibiótico fosse 4 vezes reduzida (60 µg/mL para 15 µg/mL), enquanto a CIM da oxacilina reduziu 16 vezes (480 µg/mL para 30 µg/mL). Nestes casos, a CIM do EBDic diminuiu em 4 vezes (500 µg/mL isoladamente para 125 µg/mL em associação). Estes resultados são mostrados a seguir, na Tabela 10.

Todos os agentes antimicrobianos avaliados no *checkerboard* são bactericidas. Contudo, os três pertencem a classes diferentes e, portanto, seus mecanismos de ação também são diferentes. Gentamicina é um derivado aminoglicosídico, cujo efeito bactericida acontece devido à interação específica à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, interrompendo a síntese proteica. Ciprofloxacina, fármaco pertencente à classe das fluoroquinolonas, age inibindo a topoisomerase IV de bactérias Gram positivas e a topoisomerase II das bactérias Gram negativas. Oxacilina é uma penicilina semissintética, que age inibindo a formação de ligação cruzada entre cadeias de peptideoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana (GUIMARÃES et al., 2010).

A prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente a agentes antimicrobianos, em especial *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA), é uma questão preocupante

devido à possibilidade de causar infecções fatais que são difíceis de tratar (ZEHRA et al., 2019). Este agente etiológico pode causar diferentes tipos de infecções, como as comunitárias adquiridas e as nosocomiais, sendo que o aumento da prevalência de cepas MRSA representa um problema sério para pacientes hospitalizados (MACEDO et al., 2013). Logo, torna-se importante que pesquisas sejam realizadas visando a descoberta de novos agentes antimicrobianos.

Vários estudos foram realizados utilizando compostos isolados de extratos vegetais, micro-organismos e até mesmo compostos sintéticos combinados com agentes antimicrobianos (CHAVES et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2018). Segundo Macedo et al. (2013), o efeito sinérgico entre produtos naturais e agentes antimicrobianos é uma área de enfoque de pesquisa fitoterápica com perspectiva de desenvolvimento de novos fármacos, pois surge como uma ferramenta poderosa para ajudar a selecionar uma terapia antimicrobiana mais eficaz e menos tóxica.

Tabela 10 - Resultados da avaliação do sinergismo entre o Extrato Bruto obtido com Diclorometano (EBDic) e os antibióticos, realizado utilizando o método do *checkerboard*, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* Multidrogas resistentes (MDR)

<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA-699								
Combinação	CIM Atb	CIM EBDic	CIM Atb após	CIM EBDic após	FIC_A	FIC_B	FICI	Efeito
Atb + Extrato	(µg/mL)	(µg/mL)	combinação	combinação				
Cip + EBDic	30 µg/mL	500 µg/mL	15 µg/mL	62,5 µg/mL	0,5	0,125	0,625	Parcialmente sinérgico
Gent + EBDic	480 µg/mL		15 µg/mL	62,5 µg/mL	0,031	0,125	0,156	Sinérgico
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA-709								
Atb + Extrato	CIM Atb	CIM EBDic	CIM Atb após	CIM EBDic após	FIC_A	FIC_B	FICI	Efeito
	(µg/mL)	(µg/mL)	combinação	combinação				
Cip + EBDic	60 µg/mL	500 µg/mL	15 µg/mL	125 µg/mL	0,25	0,25	0,5	Parcialmente sinérgico
Oxa + EBDic	480 µg/mL		30 µg/mL	125 µg/mL	0,0625	0,25	0,312	Sinérgico

Atb: Antibiótico; CIM: Concentração Inibitória Mínima; EBDic: Extrato Bruto obtido com Diclorometano; FICA: *Fraction Inhibitory Concentration* do antibiótico; FICB: *Fraction Inhibitory Concentration Index* do extrato EBDic; FICI: *Fraction Inhibitory Concentration Index*

As interações entre antimicrobianos e produtos de origem natural podem aumentar a eficácia dos antibióticos e são uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes a múltiplas drogas, especialmente cepas de MRSA para as quais uma terapia eficaz é limitada e cara (MACEDO et al., 2013). Segundo Figueiredo et al. (2018) e Mun et al. (2018), esses “adjuvantes dos antimicrobianos” podem agir aumentando o espectro da atividade antibacteriana de antibióticos conhecidos contra cepas resistentes, bloqueando a resistência e combatendo as infecções bacterianas por meio de um efeito sinérgico com o antibiótico. Segundo Chaves et al. (2018), a associação entre antibióticos e compostos obtidos a partir de fontes naturais, estando isolados ou não, pode atuar simultaneamente em diferentes locais-alvo, o que é responsável pelos melhores resultados observados em comparação com o antibiótico isoladamente.

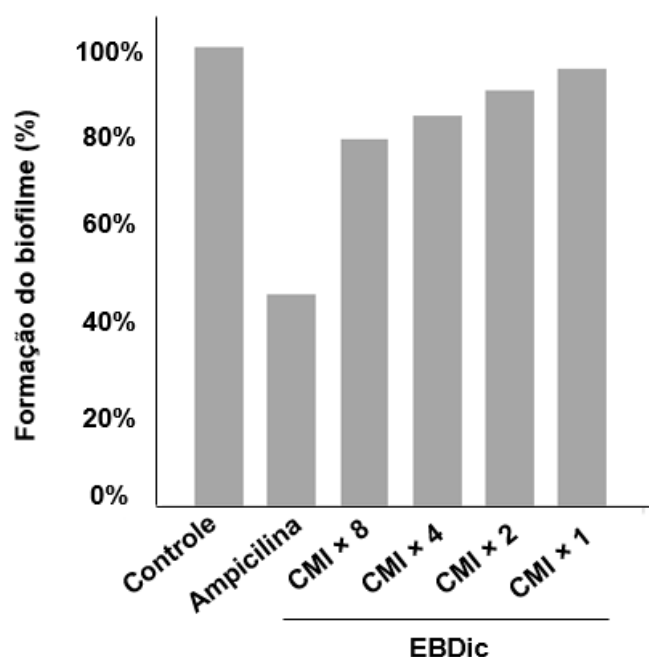
Ferreira et al. (2018) avaliaram o sinergismo entre uma lectina isolada da planta *Alpinia purpurata* e oxacilina frente a cepas MRSA. Vale ressaltar que, isoladamente, a proteína não apresentou atividade frente a tais cepas, porém, quando associada ao antibiótico, observaram que houve efeito sinérgico, com FICI variando de 0,12 a 0,5. Silva et al. (2018) encontraram efeito sinérgico entre um extrato obtido a partir das folhas da planta *Vernonia condensata*, utilizando acetato de etila como solvente extrativo, e ampicilina, frente a uma linhagem MRSA. A CIM do antibiótico reduziu de 1000 µg/mL para 250 µg/mL, enquanto a do extrato reduziu de 1250 µg/mL para 78 µg/mL. Mun et al. (2018) investigaram a combinação entre punicalagin, um tanino isolado da planta *Punica granatum*, e o antibiótico oxacilina frente a 6 cepas de MRSA. Os efeitos foram sinérgicos para todos os ensaios, com FICI variando de 0,15 a 0,5, havendo reduções consideráveis nas CIMs tanto do composto como do antibiótico.

EBDic também foi avaliado quanto à capacidade de inibir a formação de biofilme. Para tanto, utilizou-se a linhagem *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02, a qual é capaz de formar biofilme em microplacas de poliestireno (FERREIRA et al., 2018). Ao todo, foram avaliadas 4 concentrações de EBDic: CIM × 8, CIM × 4, CIM × 2 e CIM × 1 (250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente).

Considerou-se que a formação de biofilme no controle positivo representa 100% da formação de biofilme. Assim como Ferreira et al. (2018), ampicilina foi utilizado como controle negativo neste trabalho. Para tanto, o antibiótico foi capaz de inibir a formação do biofilme em 46,67%. EBDic, por sua vez, apresentou como percentuais de inibição: 20%, 14,7%, 9,3% e 4,7% para as concentrações de CIM ×

8, CIM $\times$ 4, CIM $\times$ 2 e CIM $\times$ 1, respectivamente. Os resultados desta etapa estão ilustrados a seguir, na Figura 32.

Figura 32 - Atividade anti-formação de biofilme de EBDic contra a linhagem *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02, utilizando 4 concentrações diferentes do extrato e Ampicilina (960 μ g/mL) como controle negativo



Fonte: O autor

Biofilmes são comunidades microbianas complexas, as quais se ligam a um tecido ou uma superfície abiótica. São compostas por microcolônias envolvidas em uma matriz de substâncias poliméricas produzidas pelos próprios micro-organismos (MOURA et al., 2017), a qual serve para protegê-los das condições adversas externas e aumentar a resistência aos antibióticos (SILVA et al., 2018). Os mesmos autores acrescentam que biofilmes bacterianos são responsáveis por 65 a 80% dos casos de infecções crônicas e nosocomiais. Ademais, segundo Mataraci e Dosler (2012), devido à maior resistência dos organismos associados aos biofilmes, os mesmos representam um problema para a saúde pública grave, considerando o potencial que esses organismos possuem em causar infecções graves em pacientes com superfícies inertes, como dispositivos médicos para uso interno (por exemplo, cateteres) ou externo. Ainda é possível destacar que, segundo Ko et al. (2019), a formação de biofilme é uma das causas de as bactérias estarem se tornando resistentes a antibióticos.

Silva et al. (2019) avaliaram a inibição da formação de biofilme por *S. aureus* utilizando uma lectina isolada da planta *Punica granatum*. Os autores encontraram uma inibição de 50% quando a proteína foi testada numa concentração maior que 200 µg/mL. Ferreira et al. (2018), os quais estudaram a atividade anti-formação de biofilme pela cepa *S. aureus* UFPEDA-02 (não-resistente, a mesma testada no presente trabalho) utilizando uma lectina isolada da planta *Alpinia purpurata*, encontraram uma inibição de 50 a 60%, sendo que a máxima concentração testada foi de 50 µg/mL. Estes resultados se encontram em discordância com o presente trabalho, tendo em vista que o maior percentual de inibição encontrado foi de 20%, na maior concentração testada (250 µg/mL). Isto pode ter acontecido por EBDic ter sido avaliado em sua forma bruta, portanto, os componentes ativos do extrato estavam em baixa concentração.

Rahman et al. (2017) avaliaram a inibição da formação do biofilme de *S. aureus* pelo extrato dos frutos de *Amomum tsaoko*. As concentrações testadas variaram de 0,5 mg/mL a 4 mg/mL e o percentual de inibição variou de 16,18% a 47,06%, respectivamente. Tais autores justificam este resultado afirmando que sem mais análises, como o isolamento e a investigação do potencial de cada composto, fica difícil explicar quais componentes são responsáveis por essa inibição.

Jain et al. (2018) testaram o potencial anti-formação de biofilme por *S. aureus* utilizando três espécies diferentes de cúrcuma (em sua forma pura) e seus alcaloides e flavonoides. Cada substância foi avaliada em concentrações que variaram de 0,5 a 10 mg/mL, concentrações bem mais elevadas que as testadas no presente trabalho. O extrato bruto na concentração de 0,5 mg/mL teve percentual de inibição igual a 26,86%, valor muito próximo do que foi encontrado neste trabalho (20% para 0,25 mg/mL). Na mesma concentração, nenhum dos 6 compostos isolados obtiveram um percentual de inibição maior. Contudo, os autores apenas afirmaram que cúrcuma e seus flavonoides e alcaloides possuem atividade antibiofilme, mas não discutiram estes resultados.

Bazargani e Rohloff (2016) estudaram a inibição da formação de biofilme por *S. aureus* utilizando óleos essenciais e extratos brutos de hexano, diclorometano e metanol de 3 plantas (*Mentha piperita* L., *Coriandrum sativum* L. e *Pimpinella anisum* L.). Nos 3 casos, os melhores percentuais de inibição foram apresentados pelos óleos essenciais das plantas, variando de 67,5 a 91%, sendo importante ressaltar que os mesmos foram avaliados na ordem de µg/mL. Com relação aos extratos, os de

diclorometano, metanol e hexano obtidos de *C. sativum* e *P. anisum* não inibiram a formação de biofilme, apesar das altas concentrações avaliadas (4 mg/mL). Apenas os extratos de *M. piperita* tiveram atividade, variando de 39,2 a 70%. Os autores atribuem essas diferenças nos resultados ao processo extrativo, supondo que os compostos ativos presentes nos óleos poderiam não estar presentes nos extratos obtidos com solventes orgânicos.

No presente trabalho, também foi avaliado o potencial antioxidante do extrato bruto, o qual foi determinado através da capacidade dos componentes antioxidantes presentes no EBDic em sequestrar os radicais estáveis DPPH, ABTS e AAT. Os fenóis totais foram medidos em função do ácido gálico. Nas condições testadas, EBDic apresentou maior percentual de sequestro de radicais livres quando avaliado pelo método do DPPH (89,7%), seguido pelo AAT (10,3%) e pelo ABTS (4,98%). A Tabela 11 mostra os resultados para cada um dos ensaios.

Tabela 11 - Resultados de fenóis totais e atividades antioxidantes promovidas por EBDic, na concentração de 800 µg/mL

Amostras	DPPH (%)	ABTS (%)	AAT (%)	Fenóis totais (mgAGE/g)
EBDic	89,70 ± 13,4	4,98 ± 0,58	10,30 ± 0,01	289,5 ± 0,40
BHT	93,13 ± 0,56	98,12 ± 0,10	99,80 ± 0,50	-
Ácido ascórbico	90,04 ± 0,16	100	100	-

(-): não determinado. BHT: *Butylated hydroxytoluene*

A busca por compostos que possuam potencial antioxidante justifica-se pelo fato de os antioxidantes fornecermos grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, pois são compostos que protegem o organismo dos danos causados pelos radicais livres (OLIVEIRA, 2015), pois são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) como o $O_2^{\cdot -}$ (superóxido), $RO^{\cdot}$ (radical alcóxila), NO (óxido nítrico), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e $ROO^{\cdot}$ (radical peróxila) (ARORA e CHANDRA, 2010).

As ERO e os radicais livres contêm elétrons desemparelhados na camada de valência, logo são instáveis e por isso reagem rapidamente com as outras substâncias

ou moléculas no corpo, levando a lesão celular ou tecidual (CHALAMAIAH et al., 2012). De acordo com Achkar et al. (2013), os radicais livres são um dos causadores de reações de oxidação em sistemas biológicos, as quais têm ligação direta com o surgimento de diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e outros distúrbios neurodegenerativos, aterosclerose, artrite reumática, catarata e inflamação (OLIVEIRA, 2015).

Segundo Chalamaiah et al. (2012), os antioxidantes sintéticos têm sido relatados como compostos que trazem potenciais riscos à saúde e, devido a isso, a busca por antioxidantes naturais seguros é importante. Plantas e fungos são conhecidos pela produção de compostos com propriedades antioxidantes e, de acordo com Arora e Chandra (2010), os fungos têm sido utilizados em pesquisas pela comunidade científica devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários, dentre os quais há compostos que possuem atividade antioxidante.

O teste do DPPH, o qual é um radical livre estável comumente usado para avaliar a potência antioxidante *in vitro*, baseia-se na eliminação de radicais DPPH e reflete a capacidade do extrato em transferir elétrons ou átomos de hidrogênio (SANDHU; PUNIA; KAUR, 2016). Observou-se que EBDic foi capaz de sequestrar em torno de 90% dos radicais DPPH livres presentes na amostra. Valor semelhante (83%) foi encontrado por Wang et al. (2013), os quais investigaram a atividade antioxidante de polissacarídeos extracelulares isolados do caldo fermentado por uma linhagem de *A. terreus*, utilizando o método do DPPH. Já Sandhu et al. (2016) relataram que o melhor percentual antioxidante de uma linhagem de *A. awamori* *kazawa* foi de 66,8%, utilizando fermentação sólida e extraíndo os metabólitos com hexano. Segundo estes autores, o tipo de substrato utilizado no cultivo pode inferir na quantidade de fenóis totais produzidos pelo fungo, o que pode explicar o menor percentual obtido em comparação ao que foi encontrado no presente trabalho.

Dewi et al. (2015) avaliaram, também pelo método DPPH, o potencial antioxidante de compostos isolados a partir de um extrato oriundo do cultivo submerso de *Aspergillus terreus*, utilizando acetato de etila como solvente extrativo. Os autores atribuem a atividade significativa à presença de grupos fenólicos na estrutura dos 3 compostos avaliados. De acordo com Achkar et al. (2013), a atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada à sua estrutura química e à capacidade redutora, graças à ressonância do anel aromático existente na estrutura, o que confere

estabilidade. Segundo os mesmos autores, a atividade antioxidante é consequência neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais. Assim, supõe-se que a atividade antioxidante apresentada por *A. terreus* URM 7731 pode estar relacionada com a presença de fenóis no EBDic (em torno de 290 mgAGE/g de extrato).

Trabolsy et al. (2014) também atribuíram a atividade antioxidante de uma linhagem de *A. terreus* à estrutura de um dos metabólitos isolados a partir do seu cultivo. No caso, trata-se da terreína, o qual é comumente produzido pela espécie e extensivamente descrito na literatura. Segundo os autores, essa propriedade antioxidante se deve à propriedade isomérica da estrutura da terreína.

Como foi discutido anteriormente, a produção de metabólitos secundários por micro-organismos e plantas é susceptível à condição ambiental em que os mesmos se encontram. Ou seja, no cultivo microbiano, as fontes nutricionais e as condições de incubação são determinantes nos tipos e quantidades de metabólitos produzidos por determinada espécie. Arora e Chandra (2010) também avaliaram a produção de compostos antioxidantes por uma linhagem de *A. terreus* e a influência que diferentes fontes de carbono e nitrogênio teriam sobre o potencial antioxidante da linhagem, encontrando que glicose e nitrato de sódio foram as melhores fontes. Comparando com o presente trabalho, EBDic foi produzido utilizando extrato de malte, o qual possui maltose como fonte de carbono, a qual foi bem utilizada pela linhagem *A. terreus* URM 7731, considerando o resultado obtido a partir do teste do DPPH.

A atividade de eliminação de radicais ABTS livres reflete a doação de hidrogênio pelo extrato, bem como pela capacidade de quebra da cadeia do mesmo. Este ensaio é bastante utilizado porque pode ser usado para avaliar tanto antioxidantes lipofílicos e como hidrofílicos (SANDHU et al., 2016). No presente trabalho, pode-se observar que a capacidade de sequestro do radical ABTS por EBDic não foi satisfatório (apenas 5%). Segundo Handa et al. (2019), compostos podem apresentar resultados diferentes para métodos distintos de avaliação da atividade antioxidante. Neste caso, EBDic apresentou correlação positiva forte com DPPH e uma forte correlação negativa com ABTS. Como explicam os mesmos autores, isso implica que a atividade antioxidante de EBDic tem maior correlação com o mecanismo de doação de hidrogênio (DPPH) do que com o mecanismo de doação de elétrons (ABTS).

O extrato EBDic foi fracionado por cromatografia em coluna *flash*, a partir da qual foi possível se obter 20 frações, baseando-se nos perfis de eluição (Tabela 1, item 3.13.1). As 20 frações foram encaminhadas para investigação da atividade antimicrobiana. O rendimento das frações e os resultados referentes às CIM e CMB das mesmas encontram-se descritos a seguir, na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentrações Mínimas Inibitórias (CIM) e Concentrações Mínimas Bactericidas (CMB) das 20 frações oriundas do fracionamento do extrato EBDic, utilizando cromatografia em coluna *flash*, frente a *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02

Frações	Rendimento	CIM	CMB
F-1	0,8 mg	250 µg/mL	500 µg/mL
F-2	5,1 mg	500 µg/mL	1000 µg/mL
F-3	55,4 mg	500 µg/mL	1000 µg/mL
F-4	20,9 mg	1000 µg/mL	1000 µg/mL
F-5	35,0 mg	500 µg/mL	1000 µg/mL
F-6	41,9 mg	500 µg/mL	1000 µg/mL
F-7	8,3 mg	500 µg/mL	1000 µg/mL
F-8	5,4 mg	1000 µg/mL	1000 µg/mL
F-9	43,9 mg	1000 µg/mL	1000 µg/mL
F-10	36,2 mg	500 µg/mL	500 µg/mL
F-11	101,6 mg	1000 µg/mL	1000 µg/mL
F-12	106,8 mg	500 µg/mL	1000 µg/mL
F-13	2,9 mg	500 µg/mL	500 µg/mL
F-14	2,5 mg	500 µg/mL	500 µg/mL
F-15	22,4 mg	125 µg/mL	125 µg/mL
F-16	6,9 mg	500 µg/mL	500 µg/mL
F-17	9,5 mg	1000 µg/mL	1000 µg/mL
F-18	1,9 mg	500 µg/mL	500 µg/mL
F-19	3,3 mg	1000 µg/mL	1000 µg/mL
F-20	2,0 mg	500 µg/mL	500 µg/mL

As menores CIM e CMB foram apresentadas pela fração F-15, com valores iguais a 125 µg/mL. Este, por sua vez, é 4 vezes maior que a CIM/CMB do extrato

EBDic antes de ser fracionado (31,25 µg/mL), inferindo, assim, que a junção das 20 frações constitua um sinergismo. Ou seja, nas condições testadas, as 20 frações reunidas possuem maior potencial antibacteriano.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Figueiredo et al. (2018) ao investigarem o potencial antimicrobiano do extrato obtido a partir algas da espécie *Canistrocarpus cervicornis*, utilizando diclorometano como solvente extrativo, e de compostos isolados a partir desse extrato. Os autores verificaram que os diterpenos isolados tinham menor efeito modulatório frente a cepas de *S. aureus* quando comparados ao extrato bruto, e atribuem este resultado à presença de outros metabólitos no extrato. Ferrari (2008) encontrou que as frações do extrato de *Lychnophora trichocarpa* possuíam atividade anti-inflamatória menor que o extrato bruto, o que sugeria sinergismo entre as frações.

Diante dos resultados obtidos com a avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir de EBDic, foram realizadas análises visando investigar a composição de EBDic e fração F-15 (a que apresentou melhores resultados de CIM e CMB). Assim, primeiramente, EBDic foi submetido à análise por CG-EM.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) é uma tecnologia robusta, representando uma estratégia analítica vantajosa por possibilitar a identificação de compostos presentes em matrizes complexas, com sensibilidade e reprodutibilidade excelentes (SALVATORE et al., 2018). É usada principalmente para analisar compostos voláteis (com ponto de ebulição entre 20 e 350 °C) e metabólitos primários polares após a derivatização para torná-los voláteis (TYC et al., 2017).

O processo de derivatização torna um analito detectável em métodos cromatográficos, como o CG, e faz com que compostos altamente polares sejam suficientemente voláteis, de modo que possam ser eluídos a temperaturas razoáveis sem decomposição térmica ou rearranjo molecular (ORATA, 2012). No presente trabalho, as amostras foram submetidas ao processo de derivatização porque, segundo Salvatore et al. (2018), muitos metabólitos presentes em extratos fúngicos não são voláteis ou podem vaporizar diante da exposição a altas temperaturas. Assim, EBDic e F-15 foram misturadas ao reagente BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida), o qual é um reagente universal de sililação (um dos procedimentos de derivatização mais comuns empregados na análise de CG-EM) e tem melhor capacidade doar sililo do que outros reagentes (CARRO et al., 2013).

Assim, após a derivatização, os compostos obtidos presentes nas amostras tendem a ser mais voláteis, de forma a apresentar melhor estabilidade térmica que os originalmente presentes nas amostras não tratadas. Porém, mesmo utilizando este artifício, perfil de metabólitos secundários obtido não foi satisfatório. Desta forma, buscou-se outro método analítico como ferramenta para conhecer as substâncias presentes nas amostras, escolhendo-se, assim, a rede molecular.

Rede molecular (do inglês, *molecular networking*) é uma estratégia computacional que ajuda na visualização e interpretação da constituição química de amostras, a qual pode ser detectada usando espectrometria de massas. Fornece uma visão geral de todos os íons de moléculas que foram detectados e fragmentados durante a análise da amostra utilizando a técnica de espectrometria de massas, além das relações químicas entre eles. Este método de espectrometria de massa baseado em fragmentação é referido como EM/EM (QUINN et al., 2017).

Esta técnica fundamenta-se no pressuposto de que moléculas estruturalmente similares compartilham padrões de fragmentação de EM/EM similares. Logo, a semelhança dos espectros EM² pode ser usada como um critério para avaliação de relações químicas. De acordo com Yang et al. (2013), a rede molecular é implementada em três etapas fundamentais: 1) os espectros MS/MS da amostra analisada são coletados; 2) uma rede molecular usando “scores de cosseno” é gerada. Estes dados que medem a relação em espectros EM/EM e podem ser visualizados usando o *Cytoscape*, uma ferramenta utilizada para visualizar correlações de grandes conjuntos de dados; a rede molecular é analisada. Portanto, uma rede molecular consiste em uma representação visual da semelhança química de qualquer conjunto de compostos, na forma de uma relação molecular.

Usando um *score* de similaridade baseada em vetores, os espectros de consenso são plotados como nodos em uma rede, comparados entre si e vinculados de acordo com seus graus de similaridade (OLIVON et al., 2017). Dentro da rede, um nodo corresponde a um espectro de consenso MS/MS, que consiste em uma fusão matemática de espectros EM/EM com padrões de massa e pico precursor quase idênticos e é tipicamente rotulado com a massa precursora. As arestas (linhas) conectam nodos com os espectros de consenso EM/EM relacionados (YANG et al., 2013). Os aglomerados resultantes (*clusters*) permitem a visualização de moléculas idênticas e análogas, viabilizando a detecção mais rápida de metabólitos conhecidos em comparação com um banco de dados de produtos naturais e a identificação de

análogos baseados em estudos sistemáticos de fragmentação (OLIVEIRA et al., 2016).

Com base na similaridade de cosseno, os espectros de EM² das substâncias analisadas no presente estudo foram agrupados, formando *clusters*. A rede molecular gerada de EBDic e de F-15 no modo negativo possuiu 376 nodos (esse valor diminuiu após a remoção do branco) (Figura 33). As intensidades das linhas entre os nodos foram relacionadas aos valores de cosseno, indicando que quanto maior a espessura, maior o grau de similaridade entre os nodos.

Diversos estudos já foram realizados utilizando o método da rede molecular como artifício para visualizar e interpretar a composição química de amostras advindas de fungos (KLITGAARD et al., 2015; CARABALLO-RODRÍGUEZ e PUPO, 2017; OPPONG-DANQUAH et al., 2018; FAN et al., 2019) bactérias (WATROUS et al., 2012; DUNCAN et al., 2015; BOYA et al., 2017) e plantas (ABBAS-MOHAMMADI et al., 2018; NOTHIAS et al., 2018; OLIVON et al., 2018).

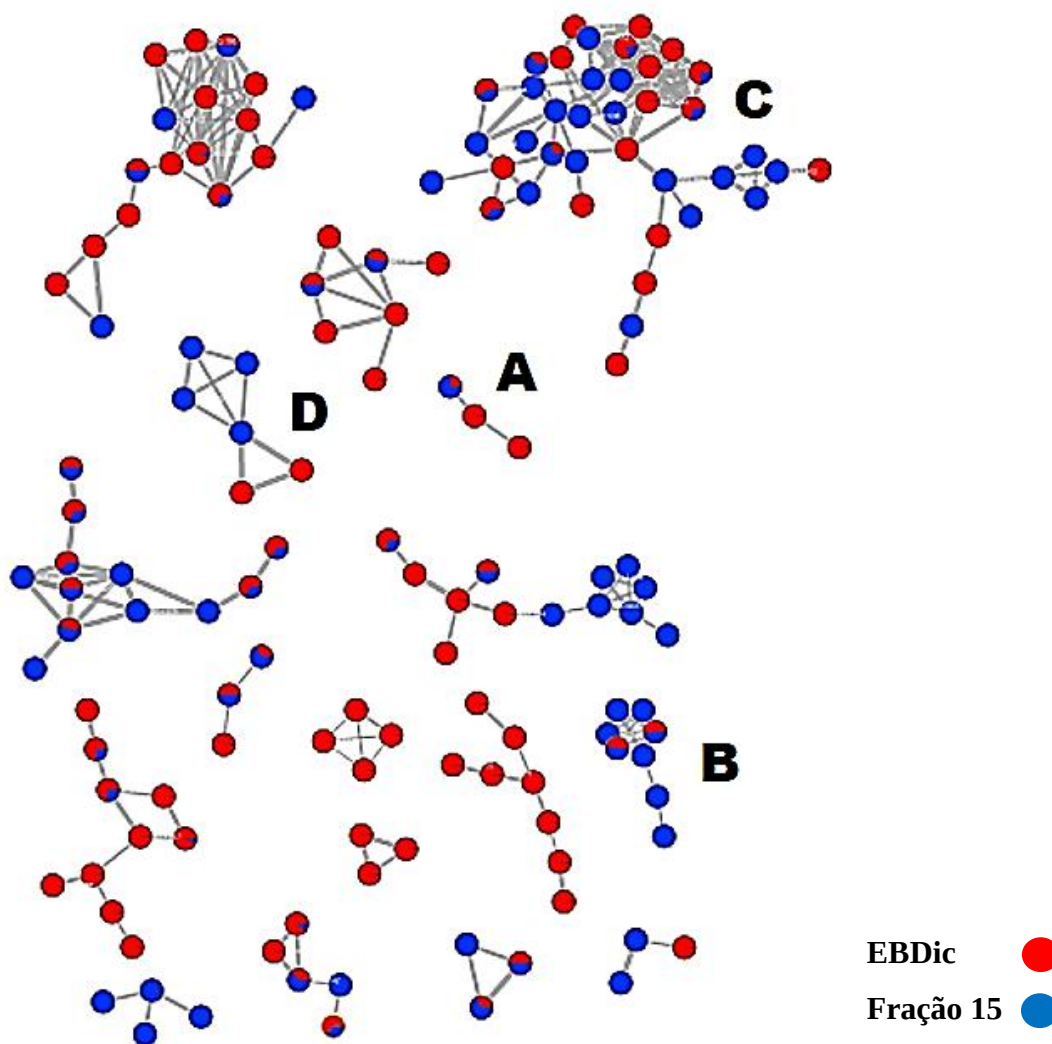
A plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), desde sua introdução no ano de 2012, permite análise automatizada de redes moleculares e compartilhamento comunitário de espectros brutos para bibliotecas espectrais colaborativas ou dados experimentais (OLIVON et al., 2017). Com relação ao presente estudo, através da biblioteca espectral da plataforma GNPS, um total de 40 anotações de metabólitos foi exibido, incluindo antraquinonas, aminoácidos, lactonas, benzofenonas, difenilas, entre outros.

O *cluster A* (Figura 34), apresentou a anotação para a m/z 269 [M-H], sugerindo a molécula de emodina, uma antraquinona comum à espécie *A. terreus* (DEWI et al., 2008). Ao analisar o perfil de fragmentação EM/EM m/z 269 [M-H], verificou-se a presença dos íons fragmentos m/z 241, 225, 210, 197, 182 e 171 que, de acordo Zhu et al. (2012), caracteriza as fragmentações da molécula da emodina. A partir da associação da anotação obtida pela biblioteca do GNPS, e levantamento de dados da literatura, é possível fazer o assinalamento putativo da substância como emodina. A rede molecular indica que esse metabólito está presente apenas em EBDic.

De acordo com Hsu e Chung, 2012, emodina apresenta diversas atividades biológicas: antineoplásica, anti-inflamatória e potencial toxicológico para uso em farmacologia, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de demonstrar efeitos citotóxicos (por exemplo, morte celular) através da interrupção do ciclo celular e da indução de apoptose em células cancerígenas.

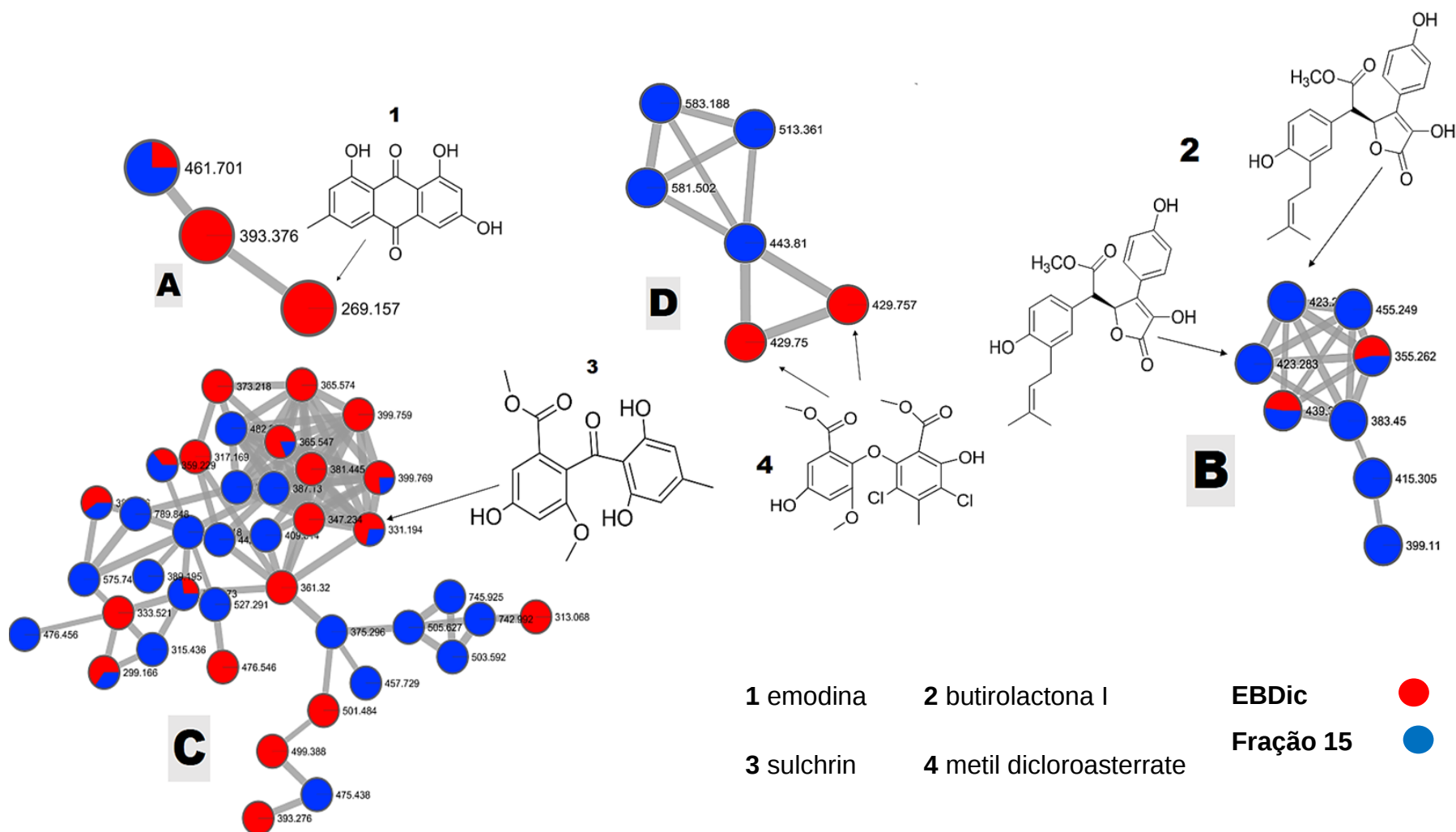
Para o *cluster* B (Figura 34), foi indicado a anotação de butirolactona I para os nodos de m/z 423 (Figura 35), no tempo de retenção de 72,4 minutos, presentes em EBDic. Palonen et al. (2014) descreveram o perfil de fragmentação da butirolactona I obtida de *A. terreus* no modo positivo. A análise de EBDic no mesmo tempo de retenção no modo positivo (72,4 minutos) apresenta um pico m/z 425 [M+H], cujo EM² [425], apresentou os íons fragmentos de m/z 307, 331, 363 e 393 (Figura 16) corroborando com Palonen et al. (2014) e sugerindo que os íons produzidos m/z 331 e m/z 393 resultam da clivagem de um grupo hidroxifenil e um grupo metoxila, respectivamente, confirmando putativamente a anotação da biblioteca GNPS.

Figura 33 - Rede molecular do Extrato Bruto obtido com Diclorometano e da fração F-15, no modo negativo, demonstrando os principais *clusters* anotados



Fonte: O autor

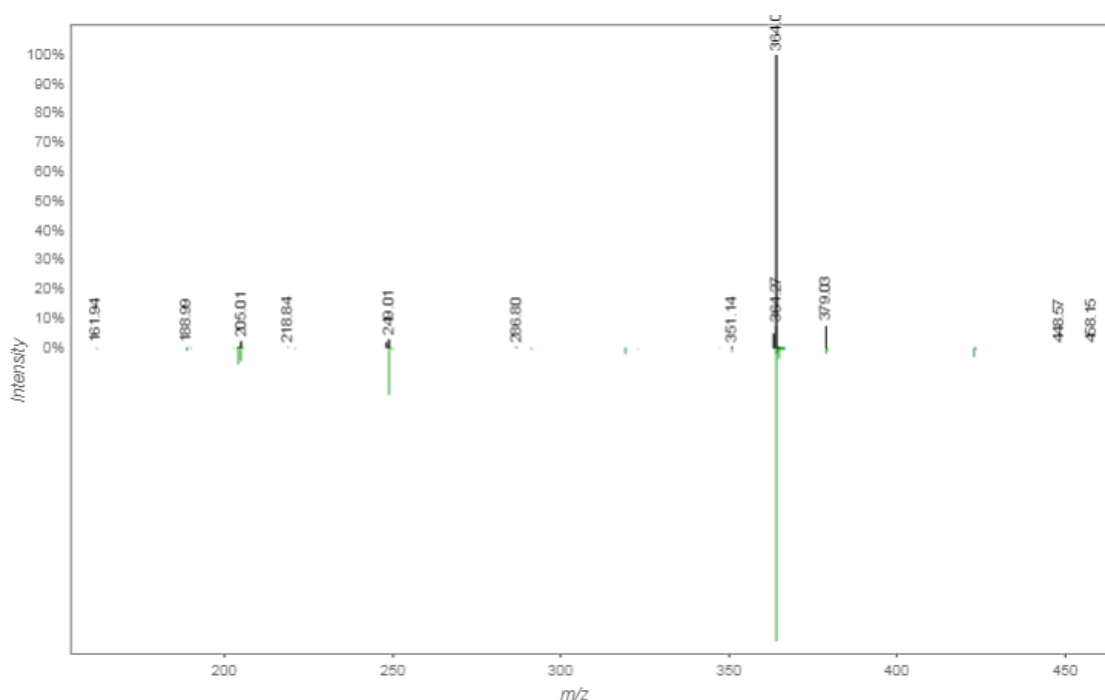
Figura 34 - Anotações para os clusters A, B, C, e D



Os butenolídeos, classe de derivados de aminoácidos, são uma classe de metabolitos fúngicos pertencentes às lignanas (QI et al., 2018a). Segundo Ibrahim et al. (2015), a espécie *A. terreus* é bem conhecida pela produção de butenolídeos. Os mesmos autores acrescentam que as butirolactonas pertencem ao grupo destes compostos e que são derivadas da desaminação oxidativa de aminoácidos tais como tirosina e fenilalanina. As butirolactonas são comumente estudadas, pois possuem diversas atividades biológicas, como: antitumoral (QI et al., 2018b), anti-inflamatória (LIU et al., 2018) citotóxica (GUO et al., 2016; LIAO et al., 2018), antidiabética (DEWI et al., 2015a, 2015b) antioxidante (DEWI et al., 2015a; DEWI et al., 2015b; IBRAHIM et al., 2015), antimicrobiana e antimalária (IBRAHIM et al., 2015).

No presente trabalho, foi possível observar que EBDic possui atividade antibacteriana -frente a *S. aureus* (com e sem padrão de resistência a antibióticos) - e antioxidante. Logo, estas propriedades podem ser relacionadas à presença de butirolactonas no extrato. Porém, outros testes de isolamento dos compostos e elucidação estrutural são necessários para afirmar esta correlação.

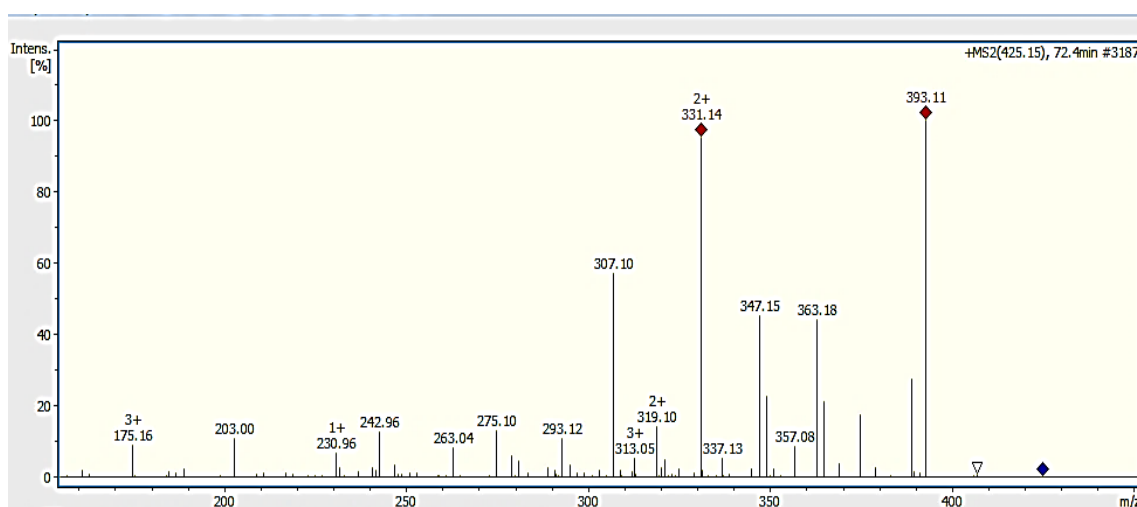
Figura 35 - Comparação entre o espectro de m/z 423 [M-H] da rede molecular (preto) com o espectro da biblioteca disponível no GNPS para a molécula de butirolactona I (verde), no modo negativo, com as correspondências observadas entre eles



Fonte: O autor

O *cluster C* (Figura 34) apresenta a anotação do nodo m/z 331 de *sulochrin*, uma benzofenona que está envolvida na via de produção da lovastatina, tendo a emodina como precursor. Contudo, *sulochrin* é produzida por *A. terreus* como um co-metabólito indesejado devido à toxicidade associada a outros contaminantes produzidos e por dificultar as etapas de purificação na produção em escala industrial (DEWI et al., 2011). Logo, visando aumentar a produção de lovastatina, pesquisas envolvendo mutagênese e triagem foi já foram realizadas visando eliminar a produção de *sulochrin*. A primeira delas foi realizada por Vinci et al. (1991), os quais conseguiram modificar geneticamente uma cepa de *A. terreus* produtora de lovastatina. Ao final, conseguiram um aumento de 20% na produção de lovastatina, concomitante a uma redução de 83% da *sulochrin*.

Figura 36 - MS² do íon m/z 425 [M+H]



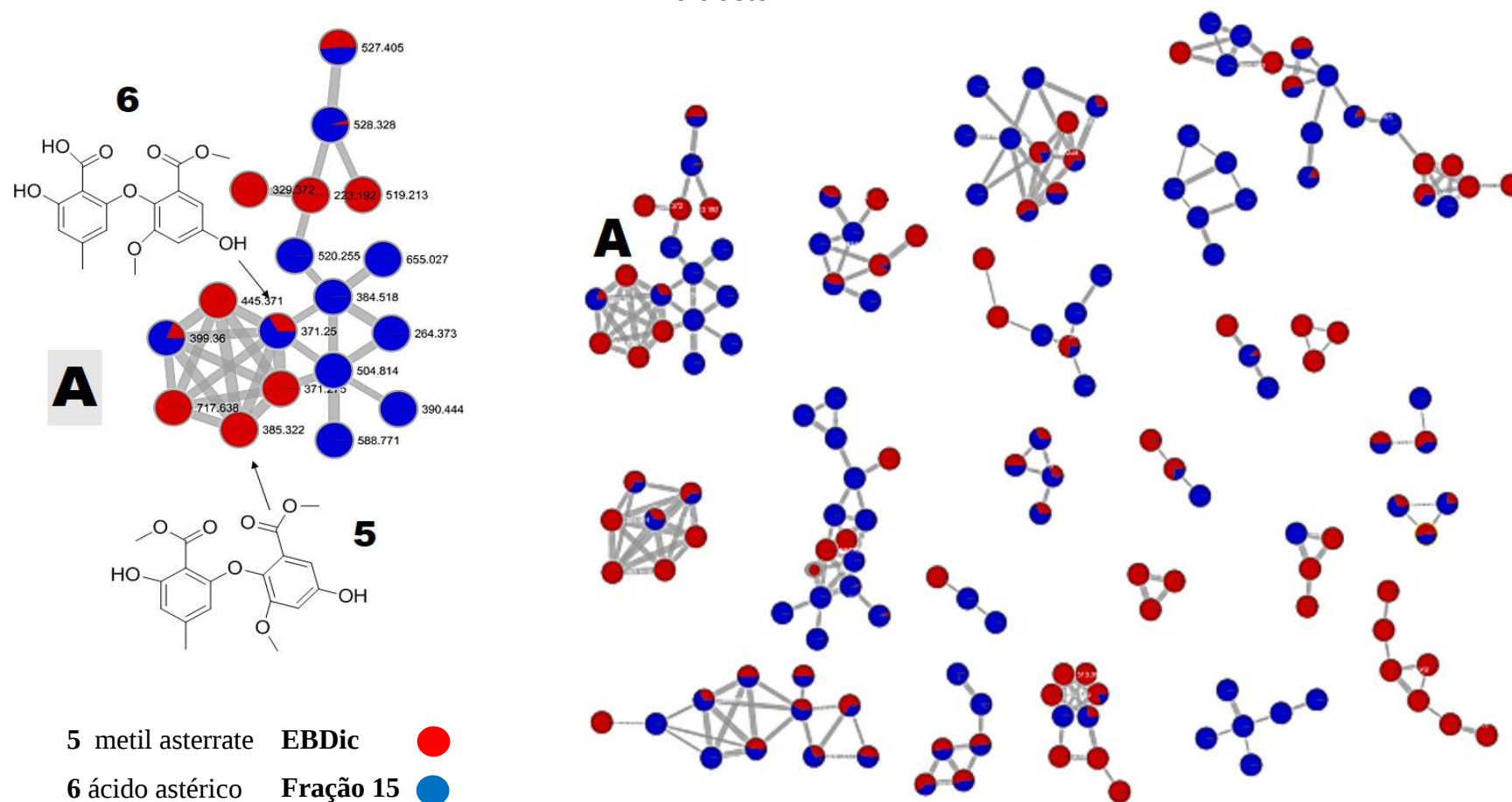
Fonte: O autor

O *cluster D* (Figura 34) apresenta a anotação do nodo m/z 429 para metil dicloroasterrate, uma difenila. Este esqueleto é comum a vários metabólitos de *A. terreus* e possui cloro, sugerindo atividade biológica associada a esta estrutura. Hargreaves et al. (2002) elucidaram estruturas de éteres difenílicos produzidos por espécies do gênero *Aspergillus*, dentre eles os compostos mono e dicloro derivados do metil asterrate. Ambos apresentaram atividade anti-nematoda frente a *Caenorhabditis elegans*.

Realizou-se, também, a rede molecular de EBDic e da fração F-15 e de *A. terreus* no modo positivo, originando 731 nodos. Porém, assim como no modo negativo, esse valor diminuiu após a remoção do branco. Os clusteres formados com três ou mais de três nodos estão representados na Figura 37. A biblioteca espectral do GNPS exibiu 83 anotações, com classes de compostos como antraquinonas, aminoácidos, éteres difenílicos, ácido fenólicos, esteroides, alcaloides, entre outros. O cluster A apresentou o nodo m/z 385 e o nodo m/z 371, cujas anotações corresponderam respectivamente ao composto metil asterrate e ácido astérico, sendo ambos éteres difenílicos comuns ao *A. terreus*.

Segundo Bizukojc e Ledakowicz (2009), tanto metil asterrate como ácido astérico podem ser formados a partir de geodina e *sulochrin*. Como citado acima, derivados de metil asterrate já foram isolados de cultivos de espécies do gênero *Aspergillus*. Tanto *sulochrin* como metil dicloroasterrate foram visualizados na rede molecular no modo negativo.

Figura 37 - Rede molecular do Extrato Bruto obtido com Diclorometano e da fração F-15, no modo positivo, e anotações para o cluster A



O ácido astérico é um éter difenílico produzido por *A. terreus*, porém já foi isolado de outros micro-organismos como *Oospora sulfurea-ochracea*, *Penicillium frequentans*, *Scytalidium spp.* e *Phoma sp.* É uma endotelina não-peptídica que atua como inibidor do fator de crescimento endotelial vascular e como antagonista do receptor da endotelina para o tratamento da fibrose pulmonar. Derivados do ácido astérico foram considerados úteis no tratamento de infarto do miocárdio e insuficiência renal (LI et al., 2008).

As redes moleculares de EBDic e de F-15 foram geradas nos modos negativo e positivo, originando 376 nodos e 731 nodos respectivamente. Estes números diminuiram depois que a remoção do branco foi realizada. Até o presente momento, 4 nodos foram investigados para o modo negativo e 2 nodos para o modo positivo. Os dados foram confrontados com a literatura. Assim, demais nodos ainda serão explorados, na tentativa de correlacionar os compostos presentes nas amostras com as propriedades biológicas das mesmas.

Assim, conhecendo a composição destas amostras via rede molecular, novos experimentos deverão ser realizados objetivando extrair os compostos e elucidar suas estruturas, além de se obter os compostos puros para repetir as atividades biológicas aqui investigadas, além de investigar outros potenciais, como anti-inflamatório e anti-tumoral.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu investigar potenciais biotecnológicos de linhagens de fungos filamentosos isoladas de uma região cuja microbiota era, até então, inexplorada. Este fato é primordial em estudos de bioprospecção, tendo em vista a possibilidade de isolar tanto espécies novas de micro-organismos como produtos de interesse biotecnológico. A região das Várzeas de Sousa possui características peculiares referentes à sua localização. O bioma da Caatinga é muito explorado no que diz respeito à biodiversidade vegetal e microbiana, destacando a sua importância quanto à obtenção de produtos de interesse biotecnológico diante da vasta gama de metabólitos secundários produzidos pelas espécies.

As técnicas utilizadas para identificar as linhagens mostraram-se efetivas, pois os 30 fungos foram identificados em nível de espécie. A utilização de mais de um tipo de método conferiu maior confiança aos resultados, comprovando a importância da abordagem polifásica. A partir da identificação, foi possível conhecer os possíveis potenciais biológicos das espécies.

Estudos envolvendo a otimização das condições de cultivo microbiano também são essenciais para aumentar a produção de metabólitos de interesse e reduzir custos. Assim, esta etapa foi realizada com a linhagem *Aspergillus terreus* URM 7731, a que apresentou os melhores resultados durante a realização do *screening* de atividade antimicrobiana. Ademais, as etapas subsequentes prosseguiram a partir de cultivos submersos da referida cepa: extração dos metabólitos com solventes orgânicos, avaliação de CIM e CMB, investigação do sinergismo com antibióticos disponíveis na prática clínica, potencial antibiofilme e atividade antioxidante. Estes testes foram realizados com o extrato bruto e forneceram resultados consideravelmente promissores, fato que merece destaque diante dos altos custos que as etapas de isolamento e purificação de compostos pode representar na obtenção de produtos direcionados à indústria farmacêutica como potenciais fármacos.

Por fim, técnicas cromatográficas e espectroscópicas foram utilizadas para investigar a composição química dos extratos produzidos pela cepa URM 7731, comprovando que a mesma é capaz de sintetizar compostos com potencial biotecnológico que merecem ser explorados visando isolamento e purificação dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. T. et al. PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS: IMPORTÂNCIA NA DIETA E NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS
Doi: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v11i2.398406>. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398–406, 2013.
- AFOUXENIDI, A.; MILOŠEVIĆ-IFANTIS, T.; SKALTSA, H. Secondary metabolites from *Stachys tetragona* Boiss. & Heldr. ex Boiss. and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 81, n. July, p. 83–85, 2018.
- AGOSTINI-COSTA, T. DA et al. Secondary Metabolites. **Chromatography and Its Applications**, 2012.
- AINDRILA SAHA; GHAZALA HAQUE, D. A. K. M.; . Isolation and Characterization of Multi Drug Resistant Pathogen \nfrom Soil Samples Collected From Hospital Disposal Site\n. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)**, v. 8, n. 5, p. 74–80, 2014.
- AKSOY, E. et al. Assessing soil biodiversity potentials in Europe. **Science of the Total Environment**, v. 589, p. 236–249, 2017.
- AL-SHAIBANI, A. B. A.; AL-SHAKARCHI, F. I.; AMEEN, R. S. Extraction and Characterization of Antibacterial Compound from *Aspergillus niger*. v. 16, n. 4, p. 167–174, 2013.
- ALBERTI, F.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 493–500, 2017.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap. 11, p. 289-371, 1998.
- ANVISA. **Deteção e identificação dos fungos de importância médica**. Ministério da Saúde, 2004.
- ARORA, D. S.; CHANDRA, P. Optimization of antioxidant potential of *Aspergillus terreus* through different statistical approaches. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 57, n. 2, p. 77–86, 2010.
- BALINI, C. L. Identificação Pela Técnica De PCR-RFLP, De *Aspergillus* Spp. Isolados De Grãos De Soja E Milho. **Revista Brasileira de Energias Renovaveis**, v. 4, n. 2, p. 83–99, 2015.
- BAZARGANI, M. M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v. 61, p. 156–164, 2016.
- BELL, T.; NEWMAN, J. A.; SILVERMAN, B. W.; TURNER, S. I.; LILEY, A. K. The

contribution of species richness and composition to bacterial services. **Nature**, v. 436, p. 1157-1160, 2005.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2–3, p. 101–107, 1998.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.

BORUTA, T.; BIZUKOJC, M. Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. **Journal of Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 53–62, 2014.

BRUN, S. et al. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. **Fungal Biology**, v. 117, n. 1, p. 32–40, 2013.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: A chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 143–163, 2004.

CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, É. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. **Química nova na Escola**, v. 34, p. 118–123, 2012.

CARRO, A. M.; GONZÁLEZ, P.; LORENZO, R. A. Applications of derivatization reactions to trace organic compounds during sample preparation based on pressurized liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1296, p. 214–225, 2013.

CASTRILLO, M. L. et al. Taxonomy and phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from yerba mate in misiones (Argentina). **BAG - Journal of Basic and Applied Genetics**, v. 23, n. 2, p. 19–27, 2012.

CAYOT, N. et al. Substitution of carcinogenic solvent dichloromethane for the extraction of volatile compounds in a fat-free model food system. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 77–88, 2016.

CELESTINO, J. D. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.

CHALAMAIAH, M. et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

CHAVES, T. P. et al. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. October 2017, p. 70–74, 2018.

CHEN, B. Y.; JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**. second edition. New Brunswick, NJ:Humana Press, 2002.

CHEN, Y. T.; CHEN, C. C. Cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection mimicking cellulitis in an immunocompetent patient: Report of a case and review of the literature. **Dermatologica Sinica**, v. 34, p. 33-36, 2016.

CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Second Informational Supplement. ninth ed. 2017.

DASAN, B. G.; BOYACI, I. H.; MUTLU, M. Nonthermal plasma treatment of *Aspergillus* spp . spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma ... **Journal of Food Engineering**, v. 196, n. January, p. 139–149, 2017.

DE FIGUEIREDO, C. S. et al. Dolastane diterpenes from *Canistrocarpus cervicornis* and their effects in modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 6419, n. May, p. 1–9, 2018.

DECONTARDI, S. et al. Polyphasic identification of *Penicillia* and *Aspergilli* isolated from Italian grana cheese. **Food Microbiology**, v. 73, p. 137–149, 2018.

DENG, H. et al. CRISPR system in filamentous fungi: Current achievements and future directions. **Gene**, v. 627, p. 212–221, 2017.

DEWI, R. et al. Evaluation of Culture Media for Butyrolactone I Production by *Aspergillus terreus* LS07 as Antidiabetic. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 66–71, 2015a.

DEWI, R. T. et al. α -Glucosidase inhibitor compounds from *Aspergillus terreus* RCC1 and their antioxidant activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 2, p. 737–743, 2015b.

DEWI, R. T.; DARMAWAN, A.; MULYANI, H. Emodin , an anthraquinone from ethyl acetate extract of *Aspergillus terreus* koji. **Proceeding of The International Seminar on Chemistry 2008**, v. 2008, n. October, p. 731–734, 2008.

DIBA, K. et al. Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important *Aspergillus* species using single restriction enzyme *Mwo*I. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 503–507, 2014.

DICKSCHAT, J. S. Biosynthesis and function of secondary metabolites. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 7, p. 1620–1621, 2011.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939–951, 2007.

DIKSHIT, R.; TALLAPRAGADA, P. Development and screening of mutants from *Monascus sanguineus* for secondary metabolites production. v. 7, n. December

2017, p. 1–6, 2018.

DONG, Q. et al. Identification and characterization of a special species of *Paecilomyces*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1587–1592, 2012.

DUNCAN, K. R. et al. Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species Article Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters. **Chemistry & Biology**, v. 22, p. 460–471, 2015.

EBRAHIMI, S. Genetic diversity of *Paecilomyces variotii* isolates by SSR marker in Kerman province , Iran. v. 2, n. June, p. 38–45, 2015.

EL KHOURY, A. et al. Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of *aflR*-*aflJ* Intergenic Spacer. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

F.P., M. et al. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 19–28, 2016.

FAN, B. et al. Influence of OSMAC-Based Cultivation in Metabolome and Anticancer Activity of Fungi Associated with the Brown Alga *Fucus vesiculosus*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 67, 2019.

FASELEH JAHROMI, M. et al. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

FELDMAN, R. et al. Treatment of *Paecilomyces variotii* pneumonia with posaconazole: case report and literature review. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 746–750, 2016.

FERNAND, M. G. et al. Fungi isolated from Madagascar shrimps - investigation of the *Aspergillus niger* metabolism by combined LC-MS and NMR metabolomics studies. **Aquaculture**, v. 479, p. 750–758, 2017.

FERRARI, F. C. “Estudo Fitoquímico Da Fração Acetato De Etila, Avaliação Da Atividade Antiinflamatória in Vitro E in Vivo E Da Toxicidade Em Camundongos De *Lychnophora Trichocarpa* Spreng. 2008.

FERREIRA, G. R. S. et al. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, n. July, p. 152–162, 2018.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health.

Nature, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 2012.

FUJITA, H.; INUKAI, N.; MATSUO, I. In vitro photosensitized lysis of red blood cells by an antifungal drug griseofulvin. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 17, n. 1, p. 77–80, 1993.

FURTADO, N. A. J. C. et al. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. **Microbiological Research**, v. 157, n. 3, p. 207–211, 2002.

GASONG, B. T.; TJANDRAWINATA, R. R. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Production of secondary metabolite E2 . 2 from *Phaleria macrocarpa* endophytic fungus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 10, p. 881–885, 2016.

GLEN, M. et al. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus forests and plantations. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 138–149, 2001.

GOMES, R.; BERLINCK, D. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. p. 27–30, [s.d.].

GÓMEZ-BETANCUR, I. et al. Antinociceptive activity of extracts and secondary metabolites from wild growing and micropropagated plants of *Renealmia alpinia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 191–197, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUO, B.H. et al. Taxol synthesis. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 15–20, 2006.

GUO, F. et al. Butenolide derivatives from the plant endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Fitoterapia**, v. 113, p. 44–50, 2016.

HARGREAVES, J. et al. New chlorinated diphenyl ethers from an *Aspergillus* species. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 7–10, 2002.

HAUGLAND, R. A. et al. of Selected *Aspergillus* , *Penicillium* and *Paecilomyces* Species. **PRism**, v. 210, n. 2004, p. 198–210, 2004.

HAYNES, S. W. et al. Assembly of asperlicin peptidyl alkaloids from anthranilate and tryptophan: A two-enzyme pathway generates heptacyclic scaffold complexity in asperlicin E. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 42, p. 17444–17447, 2012.

HELENA, L. et al. Avaliação Da Fertilidade Dos Solos Das Várzeas From Sousa-Pb Municipality. **Engenharia Agrícola**, p. 262–267, 1998.

HERRERA BRAVO DE LAGUNA, I.; TOLEDO MARANTE, F. J.; MIOSO, R. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1455–1466, 2015.

HILLMAN, E. T.; READNOUR, L. R.; SOLOMON, K. V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated -omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 5, n. Figure 1, p. 50–56, 2017.

HSU, S. C.; CHUNG, J. G. Anticancer potential of emodin. **BioMedicine (Netherlands)**, v. 2, n. 3, p. 108–116, 2012.

HUTTEL, W. et al. Echinocandin B biosynthesis: A biosynthetic cluster from *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 and reassembly of the subclusters Ecd and Hty from *Aspergillus pachycristatus* NRRL 11440 reveals a single coherent gene cluster. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2016.

IWASHITA, K. Recent Studies of Protein Secretion by Filamentous Fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 530-535, 2002.

INGLIS, P. W.; TIGANO, M. S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 132–136, 2006.

IQBAL, S. Z. et al. The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; And evaluation of dietary intake. **Food Chemistry**, v. 210, p. 135–140, 2016.

JC, N.; J, N. Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: Linking genomics and metabolism. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, 2017.

JIANG, D. et al. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1562–1574, 2013.

JUDOVA, J. et al. The occurrence and rapid discrimination of *Fomes fomentarius* genotypes by ITS-RFLP analysis. **Fungal Biology**, v. 116, n. 1, p. 155–160, 2012.

KANG, D. et al. Culture condition-dependent metabolite profiling of *Aspergillus fumigatus* with antifungal activity. **Fungal Biology**, v. 117, n. 3, p. 211–219, 2013.

KAOUADJI, M. et al. Mycosporulone, a metabolite from *coniothyrium sporulosum*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 12, p. 2189–2192, 1993.

KAYE, K. S.; GALES, A. C.; DUBOURG, G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 542–548, 2017.

KHAN, A. A. et al. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. **Asian Pacific Journal of**

Tropical Biomedicine, v. 4, n. 11, p. 859–870, 2014.

KIZIS, D. et al. Biodiversity and ITS-RFLP characterisation of *Aspergillus* section Nigri isolates in grapes from four traditional grape-producing areas in Greece. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. CBS, Netherlands, 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: [s.n.], 1988. 197 p.

KLITGAARD, A. et al. Combining Stable Isotope Labeling and Molecular Networking for Biosynthetic Pathway Characterization. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 13, p. 6520–6526, 2015.

KO, S. J. et al. Antibacterial and anti-biofilm activity, and mechanism of action of pleurocidin against drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 70–78, 2019.

KOPPARAPU, N. K. et al. Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. **Carbohydrate Research**, v. 347, n. 1, p. 155–160, 2012.

KUMAR, P. S. et al. In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

L., M. et al. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 25–29, 2013.

LAHOUAR, A. et al. Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 242, p. 53–60, 2017.

LAU, A. F. et al. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 828–834, 2013.

LECELLIER, A. et al. International Journal of Food Microbiology Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 168–169, p. 32–41, 2014.

LESKI, T. A. et al. Molecular Characterization of Multidrug Resistant Hospital Isolates Using the Antimicrobial Resistance Determinant Microarray. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–13, 2013.

LIAO, G. et al. Asperimides A–D, anti-inflammatory aromatic butenolides from a

tropical endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Fitoterapia**, v. 131, n. October, p. 50–54, 2018.

LIPPOLIS, V. et al. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in ginger (*Zingiber officinale*) from Nigeria. **Food Control**, v. 73, p. 1061–1067, 2017.

LIU, C. et al. The influence of soil properties on the size and structure of bacterial and fungal communities along a paddy soil chronosequence. **European Journal of Soil Biology**, v. 76, p. 9–18, 2016.

LIU, M. et al. Anti-inflammatory butenolide derivatives from the coral-derived fungus: *Aspergillus terreus* and structure revisions of aspernolides D and G, butyrolactone VI and 4',8''-diacetoxy butyrolactone VI. **RSC Advances**, v. 8, n. 23, p. 13040–13047, 2018.

LIU, Z. et al. A new anti-inflammatory meroterpenoid from the fungus *Aspergillus terreus* H010. **Natural Product Research**, v. 6419, n. September, p. 1–5, 2017.

LOPES, F. C. et al. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 771–778, 2013.

LU, Q. et al. Improving solid-state properties of berberine chloride through forming a salt cocrystal with citric acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 554, n. October 2018, p. 14–20, 2019.

LUPATINI, M.; MELLO, A. M.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de scleroderma UFSMSC1 de *Eucalyptus grandis* W. HILL EX-MAIDEN. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 2677-2682, 2008.

MACHADO, S.E.F. Produção de proteases por fungos isolados no semiárido da Paraíba e na Antártida. Dissertação de Mestrado. 114p., 2015.

MADEIRA, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7343–7348, 2011.

MAGNANI, M. et al. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 1, p. 45–49, 2005.

MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6366–6371, 2012.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região 3' do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciênc. agrotec.**, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi--progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p.177-85, 2008.

MICHELIN, M. et al. Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 16, p. 2348–2353, 2010.

MIRHENDI, H. et al. *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* as the dominant black *Aspergillus*, use of simple PCR-RFLP for preliminary differentiation. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2016.

MONKAI, J. et al. Diversity and ecology of soil fungal communities in rubber plantations. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–11, 2017.

MOSTAFA, F. A. et al. Enzymatic, kinetic and anti-microbial studies on *Aspergillus terreus* culture filtrate and *Allium cepa* seeds extract and their potent applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 116–122, 2016.

MOURA, M. C. et al. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 861–874, 2017.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1–5, 2007.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.S.; A. M. **Microbiologia Médica**. p. 628, Elsevier, 2015.

NASRI, T. et al. PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 117, p. 144–147, 2015.

NI., P. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **International journal of antimicrobial agents**, v. 42 Suppl, n. PG-S25-8, p. S25-8, 2013.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. **Metabolic Pathways: Production of Secondary Metabolites - Fungi**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 2

NOMURA, T. et al. Cytotoxicity and colloidal behavior of polystyrene latex nanoparticles toward filamentous fungi in isotonic solutions. **Chemosphere**, v. 149, p. 84–90, 2016.

NOTHIAS, L. F. et al. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 758–767, 2018.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OLIVEIRA DE SOUZA, L. I. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, n. November, p. 1055–1064, 2017.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OLIVON, F. et al. Optimized experimental workflow for tandem mass spectrometry molecular networking in metabolomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5767–5778, 2017.

OPPONG-DANQUAH, E. et al. Molecular networking-based metabolome and bioactivity analyses of marine-adapted fungi co-cultivated with phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–20, 2018.

ORATA, F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. **Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications**, 2012.

PADHI, S.; TAYUNG, K. *In vitro* antimicrobial potentials of endolichenic fungi isolated from thalli of *Parmelia lichen* against some human pathogens. **Benisuef University Journal of Basic and applied Sciences**, v. 4, p.299–306, 2015.

PAGUIGAN, N. D. et al. Acetophenone derivatives from a freshwater fungal isolate of recently described *Lindgomyces madisonensis* (G416). **Phytochemistry**, v. 126, p. 59–65, 2016.

PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42S p. S25– S28, 2013.

PEYER, L. C. et al. Inhibition of *Fusarium culmorum* by carboxylic acids released from lactic acid bacteria in a barley malt substrate. **Food Control**, v. 69, p. 227–236, 2016.

PIMENTA, E. F.; VITA-MARQUES, A. M.; TININIS, A.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; WILLIAMS, D. E.; PATRICK, B. O.; DORALYN S. DALISAY, D. S.; ANDERSEN, R. J.; ROBERTO G. S. BERLINCK, R. G. S. Use of Experimental Design for the Optimization of the Production of New Secondary Metabolites by Two *Penicillium* Species. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1821–1832, 2010.

PIZZIGATTI CORRÊA, P. L. et al. Evaluation of biodiversity data portals based on requirement analysis. **Ecological Informatics**, v. 48, n. August, p. 215–225, 2018.

PRYCE, T. M.; PALLADINO, S.; KAY, I. D.; COOMBS, G. W. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS I and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Medical Mycology* October, v. 41, p. 369-38, 2003.

QUINN, R. A. et al. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143–154, 2017.

RADZIO, R.; KÜCK, U. Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 529–539, 1997.

RAINA, S. et al. Is quorum sensing involved in lovastatin production in the filamentous fungus *Aspergillus terreus*? **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 843–852, 2012.

RAJAMANIKYAM, M. et al. Biophysical and biochemical characterization of active secondary metabolites from *Aspergillus allahabadii*. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 45–56, 2017.

RASTEGARI, A. A. Profile of Secondary Metabolite Gene Cluster in Microbe. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 113–132, 2019.

REFAT, M. S. et al. Synthesis of new drug model has an effective antimicrobial and antitumors by combination of cephalosporin antibiotic drug with silver(I) ion in nano scale range: Chemical, physical and biological studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 244, p. 169–181, 2017.

REN, H.; WANG, B.; ZHAO, H. Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 48, p. 21–27, 2017.

ROSTAMI, F.; MOGHADDAM, F. K.; SABBAGH, S. K. Comparison of PCR-RFLP Based on Ribosomal Regions and SSR Markers in Genetic Diversity of Pistachio Die-Back Caused by *Paecilomyces variotii*. v. 2, n. 1, p. 1–4, 2015.

ROZYNEK, P. et al. Quality test of the microseq D2 LSU fungal sequencing kit for the identification of fungi. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 207, n. 3, p. 297–299, 2004.

S.R.M., I. et al. Aspernolides F and G, new butyrolactones from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 84–90, 2015.

S, D. et al. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 80–100, 2014.

SAHA, A.; DAS, R.; DASGUPTA, M.; DUTTA, S.; HAQUE, G.; MITRA, A. K. Isolation and Characterization of Multi Drug Resistant Pathogen from Soil Samples Collected From Hospital Disposal Site. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 8, ed. 5, ver. 4, p. 74–80, 2014.

SALVATORE, M. M. et al. GC–MS approaches for the screening of metabolites produced by marine-derived *Aspergillus*. **Marine Chemistry**, v. 206, p. 19–33, 2018.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies in Mycology**, Centraalbureau voor Schimme-cultures, Baarn, v.116, 1974.

SAMSON, R. A. et al. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 39–55, 2011.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141–73, 2014.

SANDHU, K. S.; PUNIA, S.; KAUR, M. Effect of duration of solid state fermentation by on antioxidant properties of wheat cultivars. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, 2016.

SCHORBELE, T. J.; NGUYEN-COLEMAN, C. K.; MAY, S. G. Plasmids for increased efficiency of vector construction and genetic engineering in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 58-59, p. 1-9, 2013.

SENTHIL-RAJAN, D.; RAJKUMAR, M.; SRINIVASAN, R.; KUMARAPPAN, C.; ARUNKUMAR, K.; SENTHILKUMAR, K. L.; SRIKANTH, M. V. Investigation on antimicrobial activity of root extracts of *Thespesia populnea* Linn. **Tropical Biomedicine**, v. 30, n. 4, p. 570–578, 2013.

SEPHTON-CLARK, P. C. S.; VOELZ, K. Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 102, p. 117–157, 2018.

SHU, J.; WEI, Q. D.; YUN, Y. N.; HUA, T. J.; AO, D. J. Biodiversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi in *Angelica sinensis*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 5, n. 4, p. 264-271, 2013.

SILVA, J. P. C.; CASTILHO, A. L.; SARACENI, C. H. C.; DÍAZ, I. E. C.; PACIENCIA, M. L. B.; SUFFREDINI, I. B. Anti-Streptococcal activity of Brazilian Amazon Rain Forest plant extracts presents potential for preventive strategies against dental caries. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 2, p. 91-97, 2014.

SINGH, R. S.; KAURA, H. P.; SINGH, J. Purification and characterization of a mycelial mucin specific lectin from *Aspergillus panamensis* with potent mitogenic and antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 2251–2258, 2015.

SIQUEIRA, J. P. Z. et al. Species diversity of *Aspergillus* section *Versicolores* in clinical samples and antifungal susceptibility. **Fungal Biology**, v. 120, n. 11, p. 1458–1467, 2016.

SLOOTHAACK, J. et al. Identification of a Novel L-rhamnose Uptake Transporter in the Filamentous Fungus *Aspergillus niger*. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 12, p. 1–27, 2016.

SOUSA, D. R. T.; SANTOS, C. S. S.; WANKE, B.; SILVA JÚNIOR, R. M.; SANTOS, M. C.; CRUZ, K. S.; MONTE, R. L.; NOCKER, A.; SOUZA, J. V. B. PCR-RFLP as a useful tool for diagnosis of invasivemycoses in a healthcare facility in the North of Brazil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 231–235, 2015.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846–849, 1994.

STEIGER, M. G. et al. Biochemistry of microbial itaconic acid production. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. FEB, 2013.

STÜBGER, G. et al. Characterization of Yeasts and Filamentous Fungi using MALDI Lipid Phenotyping. **Journal of Microbiological Methods**, v. 130, p. 27–37, 2016.

SUN, S. et al. Diketopiperazines and 2H-pyran-2-ones with antioxidant activity from the rice fermented with *Aspergillus luchuensis*. **Fitoterapia**, v. 125, n. 1, p. 266–272, 2018.

TELES, A. P. C.; TAKAHASHI, J. A. Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 204–210, 2013.

THROCKMORTON, K. et al. Redundant synthesis of a conidial polyketide by two distinct secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 246–259, 2016.

TOLBA, S. T. M.; NAGWA, A. A. A.; HATEM, D. Molecular characterization of rare actinomycetes using 16S rRNA-RFLP. **African Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. March, p. 185–197, 2013.

TRABOLSY, Z. B. K. AL et al. Antioxidant activity, NMR, X-ray, ECD and UV/vis spectra of (+)-terrein: Experimental and theoretical approaches. **Journal of Molecular Structure**, v. 1060, n. 1, p. 102–110, 2014.

TRYFINOPOULOU, P. et al. Quantification of *Aspergillus carbonarius* in grapes using a real time PCR assay. **Food Microbiology**, v. 51, p. 139–143, 2015.

TURBYVILLE, T. J. The anticancer activity of the fungal metabolite terrecyclic acid A is associated with modulation of multiple cellular stress response pathways. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 10, p. 1569–1576, 2005.

U., R.; P., B. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17–20, 2018.

UZOH, I. M.; BABALOLA, O. O. Rhizosphere biodiversity as a premise for application in bio-economy. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 265, n. July, p. 524–534, 2018.

VASCONCELOS, N.M.; FONTES, J.M.; LINS, M.R.C.R.; BERNARDO, G.R.B.; ARAÚJO, J.M.; LIMA, G.M.S. *Streptomyces ansochromogenes* Tur-10 produces a substance with antifungal bioactivity. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n. 2, p. 5435-5444, 2015.

VIGUERAS, G. et al. Growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus* with n-hexadecane

in submerged and solid-state cultures and recovery of hydrophobin proteins. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1606–1611, 2014.

VINCI, V. A. et al. Mutants of a lovastatin-hyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. **Journal of industrial microbiology**, v. 8, p. 113–119, 1991.

XAVIER, M. O.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; CABANA, A. L.; SILVA FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2008.

WANG, C. et al. Purification, structural characterization and antioxidant property of an extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1395–1401, 2013.

WANG, Q. et al. Lovastatin analogues and other metabolites from soil-derived *Aspergillus terreus* YIM PH30711. **Phytochemistry**, v. 145, p. 146–152, 2018.

WANG, Y. et al. Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. **Marine Drugs**, v. 9, n. 8, p. 1368–1378, 2011.

WU, C.-J. et al. Terretonin D1, a new meroterpenoid from marine-derived *Aspergillus terreus* ML-44. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–4, 2018.

YANG, F.; ABDELNABBY, H.; XIAO, Y. A mutant of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) is a novel biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 89, p. 169–176, 2015.

YANG, H. J. et al. Antifungal activity of nano and micro charcoal particle polymers against *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma virens* and *Chaetomium globosum*. **New Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 55–60, 2016.

YANG, L.-H. et al. Open-Ring Butenolides from a Marine-Derived Anti-Neuroinflammatory Fungus *Aspergillus terreus* Y10. **Marine Drugs**, v. 16, n. 11, p. 428, 2018.

YANG, S. et al. Biochemical properties of a novel glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Pichia pastoris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 784–791, 2013.

ZAEHLE, C. et al. Terrein biosynthesis in *aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 6, p. 719–731, 2014.

ZAIN, M. E. et al. Influence of growth medium on diagnostic characters of *aspergillus* and *penicillium* species. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 5, p. 280–286, 2009.

ZHANG, S. et al. Heterologous expression of VHb can improve the yield and quality of biocontrol fungus *Paecilomyces lilacinus*, during submerged fermentation. **Journal**

of Biotechnology, v. 187, p. 147–153, 2014.

APÊNDICE A - REGISTROS DAS LINHAGENS DOS FUNGOS NO GENBANK E NA MICOTECA URM, IDENTIFICADOS UTILIZANDO CARACTERES MACRO E MICROSCÓPICOS E AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8SrDNA-ITS2

Espécies	Linhagens	
	Código no Genbank	Registro URM
	-	7809
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	MG654697.1	7748
	MG654698.1	7812
	MG654699.1	7813
	MG654700.1	7749
	-	7815
<i>A. nidulans</i> (Eidam) G. Winter	MG654701.1	7750
	MG654689.1	7810
	-	7811
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	MH465124.1	7734
	MH465125.1	7735
	MH465126.1	7736
	-	7816
	MH465134.1	7817
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	MG654701.1	7818
	MH465129.1	7731
	-	7814
	MG654690.1	7741
	MH465131.1	7733
	MG654691.1	7742
	MG654692.1	7743
<i>Aspergillus fischeri</i> Wehmer	MG654693.1	7744
	MH465127.1	7737
	MH465128.1	7738
	MG654696.1	7747
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	MH465132.1	7739
	MH465133.1	7740
	MG654694.1	7745
	MG654695.1	7746

(-): apenas identificação morfológica

ANEXO A - BDA: BATATA DEXTROSE AGAR

Infusão de batatas..... 200,0 g.L⁻¹

Glicose..... 20,0 g.L⁻¹

Ágar.....15,0 g.L⁻¹

Água destilada q.s.p.....1000 mL

(pH = 5.6 ± 0.2 a 25 °C)

ANEXO B - CYA: CZAPEK-YEAST AGAR

Sacarose.....	30,0 g.L ⁻¹
Extrato de levedura.....	5,0 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	1,0 g. L ⁻¹
Ágar.....	15,0 g. L ⁻¹
Czapek concentrado*.....	10 mL. L ⁻¹
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

* Czapek concentrado: [30,0 g/100 mL de NaNO₃, 5,0 g/100 mL de KCl, 5,0 g/100 mL de MgSO₄, 0,1 g/100 mL de FeSO₄, 0,1 g /100 mL de ZnSO₄, 0,05 g/100 mL de CuSO₄])

ANEXO C - BD: CALDO BATATA DEXTROSE

Infusão de batatas.....200,0 g.L⁻¹

Glicose..... 20,0 g.L⁻¹

Água destilada q.s.p.....1000 mL

(pH = 5,1 ± 0,2 a 25 °C)

ANEXO D - EXTRATO DE MALTE

Maltose..... 800,0 g.L⁻¹

Substâncias proteicas..... 60,0 g.L⁻¹

Água destilada q.s.p.....1000 mL

(pH = 7,01)

ANEXO E - CZAPEK MODIFICADO

Sacarose.....	30,0 g.L ⁻¹
Extrato de levedura.....	5.0 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	1,0 g.L ⁻¹
Czapek concentrado*.....	10 mL.L ⁻¹
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

ANEXO F - BHI: *BRAIN HEART INFUSION*

Substrato nutriente (extrato de cérebro, extrato de coração e peptonas)	27,5 g.L ⁻¹
Glicose	2,0 g.L ⁻¹
Cloreto de sódio	1,0 g.L ⁻¹
Di-hidrogenofosfato de sódio.....	2,5 mL.L ⁻¹
Ágar.....	15,0 g.L ⁻¹
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

ANEXO G - ÁGAR SABOURAUD

Peptona.....	10,0 g.L ⁻¹
Glicose.....	40,0 g.L ⁻¹
Ágar.....	15,0 g.L ⁻¹
Água destilada q.s.p.....	1000 mL
(pH Final = 5,6 ± 0,2 a 25°C)	

ANEXO H - ÁGAR MUELLER HINTON

Peptona de caseína	17,5 g.L ⁻¹
Peptona de carne.....	2,0 g.L ⁻¹
Amido	1,5 g.L ⁻¹
Ágar	17,0 g.L ⁻¹
Água destilada q.s.p.....	1000 mL
(pH Final = 7,3 ± 0,1)	

ANEXO I - CALDO MUELLER HINTON

Peptona de caseína	17,5 g.L ⁻¹
Peptona de carne.....	2,0 g.L ⁻¹
Amido	1,5 g.L ⁻¹
Água destilada q.s.p.....	1000 mL
(pH Final = 7,3 ± 0,1)	

ANEXO J - TBE: TRIS-BORATO-EDTA

Tris Base.....	54,0 g.L ⁻¹
Ácido Bórico.....	27,5 g.L ⁻¹
EDTA 0,5 M.....	20 mL.L ⁻¹

ANEXO K - TAMPÃO DE AMOSTRA

Glicose.....	15%
Azul de bromofenol.....	0,25%