

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA

ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GIGLIOLA MAYARA AYRES D’ELIA

Prospecção de Metabólitos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) para Atividade Antimicrobiana e Produção de Proteases.

MANAUS – AM

2021

GIGLIOLA MAYARA AYRES D'ELIA

Prospecção de Metabólitos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) para Atividade Antimicrobiana e Produção de Proteases.

Orientador(a): Dra. Larissa Kirsch Barbosa

Co-orientador(a): Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, para obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

MANAUS – AM

2021

Ficha Catalográfica

GIGLIOLA MAYARA AYRES D'ELIA

Prospecção de Metabólitos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) para Atividade Antimicrobiana e Produção de Proteases.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, para obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Manaus, ____ de _____ de 2021.

Orientador(a): Dra. Larissa Kirsch Kirsch

Co-orientador(a): Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Larissa Kirsch Barbosa

Prof^ª Dra. Iêda Hortêncio Batista

Mrs. Josy Caldas Rodrigues

Dedico a meus pais e meu padrasto que sempre investiram em minha educação, e também ao meu eterno namorado (hoje esposo) que desde o início dessa jornada esteve comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre, que me permitiu vivenciar tudo isso dando-me forças e saúde durante todo esse tempo.

À minha mãe que inúmeras vezes ouviu todo meu desabafo e cansaço com os experimentos e, juntamente com meu pai, sempre me incentivando a crescer; e em especial ao meu padrasto que, desde o dia em que lhe conheci, passou a ser um exemplo em minha vida, me orientando em tudo quanto fosse possível e provendo maravilhosas oportunidades que vou levar para sempre comigo.

Ao meu querido amor, companheiro e esposo, Felipe Maia, que desde o início esteve comigo aguentando o estresse das provas, seminários, ajudando e muito com a criação de materiais didáticos para as aulas de Estágio Supervisionado, esse mérito é nosso!

A minha orientadora linda e maravilhosa, Dra. Larissa Kirsch, que em um minicurso, sem saber, despertou o meu interesse para trabalhar com fungos, e a minha maravilhosa co-orientadora, Dra. Ormezinda Celeste; obrigada por todo o apoio de vocês, todo ensinamento e paciência que tiveram comigo, mesmo nos meus momentos de lentidão, e obrigada, principalmente, por serem um exemplo de mulher virtuosa, sempre conciliando família, trabalho, lazer e estudos.

À Turma Bio UEA 2016 que permitiu diversas experiências, vivências e risadas, em especial a minha grande amiga e madrinha de casamento, Viviane Farias, por ser sempre parceira para tudo, por suportar minhas diversas crises existenciais e sempre buscar me acalmar, te amo amiga.

A toda a equipe do DMAIS – ILMD/FIOCRUZ, por me receber na casa e me ajudar no que fosse preciso, em especial a Clarice e Haile que me ajudaram e muito a desenvolver esse projeto; e a Dani por todas as conversas que ajudavam a tornar o trabalho mais leve e divertido.

A equipe de laboratório da ESA/MBT que sempre foi muito prestativa, em especial a Bruna Frazão, Cleudiane Andrade e Luana que me auxiliaram em tudo quanto foi possível para o desenvolvimento do projeto, obrigada por terem ficado até tarde comigo no laboratório filtrando material ou esperando a autoclave liberar os meios de cultura, conselhos e desabafos eram sempre os pontos altos das nossas conversas, obrigada por serem tão sinceras, amáveis e exemplos de caráter.

À Universidade do Estado do Amazonas bem como a todos os professores de Ciências Biológicas, em especial a Dra. Sônia Maciel, professora e pessoa maravilhosa que vou levar para vida toda, obrigada por seus ensinamentos; e a querida amiga bibliotecária, Tereza, que sempre nas horas vagas ouvia meus gritinhos de alegria a cada período que concluía.

“Nunca deixe ninguém te dizer que não pode fazer alguma coisa. Se você tem um sonho tem que correr atrás dele.”

À Procura da Felicidade

RESUMO

A exploração de novos antibióticos naturais é um desafio que demanda tempo e elevados custos. A indústria farmacêutica tem em grande parte abandonado estes compostos em favor do grande número de moléculas sintéticas já conhecidas e descritas na literatura. Porém, os antibióticos naturais produzidos por microrganismos possuem algumas características que fazem a busca dessas moléculas necessária. São moléculas originais, com uma imensa diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas. Sabe-se que fungos isolados de diversos substratos do bioma Amazônico são microrganismos produtores de biomoléculas com potencial terapêutico e, dentre tais fungos, podemos destacar os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Tais gêneros também são conhecidos por produzirem enzimas de interesse biotecnológico, como as proteases, que são utilizadas em diversos segmentos da indústria. Com isso, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano e proteolítico de fungos filamentosos estocados na Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, bem como caracterizar o perfil químico dos fungos com melhores atividades. Foram selecionadas 100 culturas fúngicas, sendo 50 de *Aspergillus* spp. e 50 de *Penicillium* spp., armazenadas na Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM do ILMDF/IOCRUZ. A reativação das culturas foi feita conforme literatura especializada. Para obtenção dos extratos as culturas viáveis foram cultivadas em Ágar Extrato de Levedura e Sacarose (YES), a 28°C e, após sete dias, foi feita a extração a frio dos biocompostos em Acetato de Etila. Os biocompostos extraídos foram testados frente à *Candida albicans* CFAM 1286, *Staphylococcus aureus* CBAM 0324 e *Escherichia coli* CBAM 0002, pelo método de “cup plate” e foi feita a Concentração Mínima e Inibitória (CIM). Os extratos que apresentaram atividade foram submetidos a CIM e, os que apresentaram as menores concentrações nesta (0,156 e 0,312 mg/mL) seguiram para a caracterização do perfil químico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e respectivas revelações físicas (com luz UV de 254 e 365 nm), químicas (utilizando Dragendorf, Anisaldeído, Cloreto Férrico, Sulfato Cérico e NP/PEG) e biológicas (bioautografia com *E. coli* 0002, *S. aureus* 0324 e *C. albicans* 1286) e, também foram avaliados quanto a sua produção proteolítica onde os fragmentos dos fungos foram cultivados em solução manachini por durante 5 dias, a 28°C, onde foram possíveis os testes em “Cup plate” e leitura da produção enzimática através do espectrofotômetro. Dentre os extratos obtidos das 100 culturas fúngicas selecionadas, 64% (n=64) dos extratos apresentaram atividade positiva para pelo menos um microrganismo testado com halos de inibição variando de 2 a 30 mm de diâmetro. Na CIM, dos 64 extratos que apresentaram atividade, 24% (n=15) apresentaram atividade nas menores concentrações do estudo (0,156 e 0,312 mg/mL) e estes seguiram para a CCD, onde foi possível notar uma grande variedade de compostos encontrados. Dos 15 fungos, cinco foram perdidos por contaminação, sendo apenas dez utilizados para produção enzimática. Nos testes de “Cup plate”, apenas um filtrado fúngico não apresentou atividade. Os fungos estudados apresentaram atividade satisfatória tanto para antimicrobianos quanto para a produção de proteases, contribuindo para a melhor caracterização das espécies fúngicas da região Amazônica, especificamente os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como para o avanço no setor biotecnológico. Os extratos fúngicos estudados apresentaram resultados promissores, entretanto faz-se necessário testes futuros para a melhor elucidação dos compostos.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobiano; enzimas; compostos químicos.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
EPIÍGRAFE	vii
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Fungos.....	10
1.2 Enzimas.....	13
1.3 Resistência microbiana e a busca por novos antimicrobianos	14
1.4 Antimicrobianos de origem fúngica	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Local de realização do estudo.....	19
3.2 Microrganismos.....	19
3.3 Reativação e identificação em nível de gênero dos fungos filamentosos.....	19
3.4 Extração dos bio compostos com atividade antimicrobiana	19
3.5 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de “cup plate” por difusão em ágar	19
3.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo.....	20
3.7 Análise cromatográfica dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	21
3.7.1 Revelação das cromatoplas por reveladores físicos.....	21
3.7.2 Revelação das cromatoplas por reveladores químicos	21
3.7.3 Revelação das cromatoplas por bioautografia	22
3.8 Avaliação qualitativa da produção de proteases	22
3.9 Avaliação quantitativa da produção de proteases	23
3.10 Análise estatística da produção de proteases	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

A sociedade vem cada vez mais utilizando descontroladamente antibióticos sem prescrição médica, causando muitas vezes resistência bacteriana, as chamadas bactérias super-resistentes. Com isso, há uma grande corrida científica a fim de encontrar fármacos de origem natural que possam combater tais agentes patogênicos e, nesse quesito, os fungos se destacam por possuírem diversos compostos já descritos na literatura que podem ser utilizados para a produção de fármacos promissores. Além dos compostos que podem ser antimicrobianos, os fungos também produzem diversos tipos de enzimas que, nos últimos anos, têm ganhado destaque na produção industrial movimentando milhares de dólares. Essas enzimas, tais como as proteases, podem ser utilizadas desde a indústria alimentícia até a farmacêutica, sendo de relevante importância uma vez que produtos de origem brasileira nesse ramo ainda não são facilmente encontrados. Apesar dos diversos artigos encontrados sobre fungos e seu grande potencial biotecnológico, ainda pouco se sabe sobre os fungos da região amazônica, os estudos existentes não suprem a necessidade de conhecimento a respeito destes, com isso, o presente estudo visa alcançar melhor compreensão sobre os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* da região amazônica.

1.1 Fungos

Os fungos são microrganismos que pertencem ao reino Fungi, eucarióticos, em sua maioria multicelulares, como no caso dos fungos filamentosos, com parede celular contendo quitina e α -glucano. Esses organismos não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos, são quimio-heterotróficos e realizam a absorção dos nutrientes e formam esporos (reprodução sexuada) como estruturas típicas de reprodução (TORTORA, 2012).

Os fungos apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados no ar, solo, alimentos, água, matéria orgânica em decomposição, plantas, animais e homem, sendo predominantes nas regiões tropicais que têm um clima mais quente e úmido, favorecendo a sua multiplicação. Dentre os biomas tropicais, a Floresta Amazônica contém grande biodiversidade, com uma larga quantidade de plantas, animais e microrganismos que não conhecemos totalmente (CELESTINO *et al.*, 2014).

O reino Fungi pertence ao domínio Eukaria, que reúne todos os seres eucariontes. Este reino é dividido em sete filos, sendo eles Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota, e

um grupo, chamado de fungos anamórficos, porém este último grupo não possui valor taxonômico, e seus membros estão relacionados aos filos Ascomycota e Basidiomycota (HIBBET *et al.*, 2007).

Dentre os filos pertencentes a esse reino, pode-se ressaltar o filo Ascomycota, por abrigar aproximadamente 75% de todos os fungos descritos. Tal filo tem como principal característica a presença de asco contendo ascosporos, geralmente oito, que representam a estrutura de propagação do grupo. Estes são produzidos por reprodução sexuada, porém a reprodução assexuada também pode ser encontrada. (MORAES; PAES; HOLANDA; 2009).

Na região amazônica os fungos filamentosos do filo Ascomycota merecem destaque, dentre os quais os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* fazem parte. O gênero *Aspergillus* (Figuras 1.a e 1.b) foi primeiramente catalogado por um biólogo italiano chamado Pietro Micheli, em 1729 e assim denominado devido sua morfologia assemelhar-se com um Aspergillum (Figura 2) – o aspersório onde é colocada a água benta que o sacerdote utiliza para aspergir o povo (COUTINHO; SOUZA, 2018).

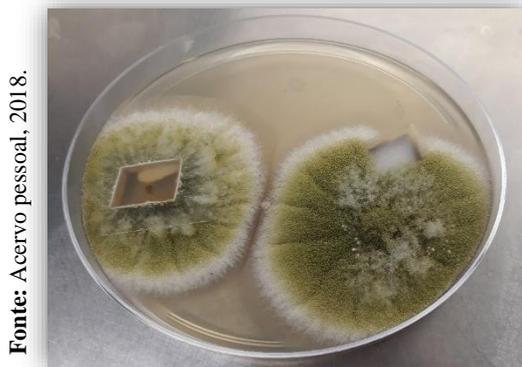


Figura 1.a – Macromorfologia de *A. flavus*: **Figura 1.b** – Micromorfologia de *A. flavus*:



Figura 2 – Aspergillum

Quanto à sua taxonomia, as espécies do gênero pertencem à classe Ascomycetos e à família Aspergillaceae, sendo importante salientar existência de mais de 200 espécies. Dentre as várias espécies de *Aspergillus*, encontram-se as seguintes: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, dentre muitas outras (COUTINHO; SOUZA, 2018). Também vale ressaltar que esse gênero contém um grande número de espécies que são conhecidas por produzir metabólitos com estruturas variadas e com consideráveis atividades biológicas (LOTFY, 2018).

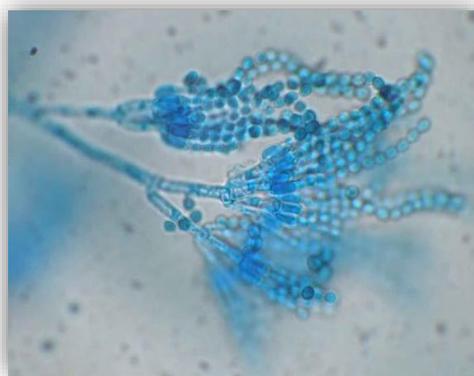
Uma variedade de produtos naturais com intrigantes atividades biológicas tem sido isolada a partir desse gênero, tais como os alcalóides, peptídeos, terpenos e ligninas (LOTFY, 2018). Apesar das espécies de *Aspergillus* serem muito comuns em suas áreas de distribuição, os constituintes bioativos do gênero ainda não são amplamente explorados.

Destaca-se também o gênero *Penicillium* (Figuras 3.a e 3.b). O nome desse gênero significa “escova”, devido sua morfologia assemelhar-se a uma, e está classificado como pertencente ao subfilo Pezizomycotina, classe Eurotomycetes, ordem Eurotiales e família Trichocomanaceae (MOURA, 2018).



Fonte: Acervo pessoal, 2018.

Figura 3.a – Macromorfologia de *Penicillium sp.*



Fonte: Tomé R, 2011.

Figura 3.b – Micromorfologia de *Penicillium sp.*

Espécies desse gênero possuem uma grande diversidade, tanto em sua morfologia quanto na produção dos metabólitos primários e secundários, produzindo compostos que podem ser utilizados para os mais diversos fins, tais como as enzimas, peptídeos, micotoxinas, antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, e fungicidas, de grande potencial biotecnológico (MOURA, 2018).

1.2 Enzimas

Em seu metabolismo primário, os fungos contam, dentre outros compostos, com a produção de proteínas, dentre as quais podemos ressaltar as enzimas, que funcionam como catalizadores biológicos. Tal produção vem se destacando cada vez mais, como sendo uma das áreas da biotecnologia que mais cresce atualmente, agitando cada vez mais o mercado financeiro nos últimos anos, justamente devido essa alta diversidade que os compostos possuem e à grande variedade de técnicas disponíveis mais simples e de custo reduzido para a extração destas moléculas (CHAMY, 2017).

Segundo AZEVEDO (2018) são diversos os segmentos financeiros dentre os quais as enzimas podem ser utilizadas. Além do fato de servirem como fonte de lucro para as indústrias de maneira geral, também podem ser utilizadas visando à sustentabilidade, uma vez que demandam menos custos, gastos com energia, produtos químicos, água e tempo de produção.

A grande variedade de enzimas industriais que são encontradas é, em sua maioria, obtida a partir de microrganismos devido terem uma produção muito rápida, alto rendimento (transformando grande parte do substrato em que estão inseridos em metabólitos), alta versatilidade e baixa complexidade genética para a manipulação de seus indivíduos (CHAMY, 2017).

Dentre tais microrganismos, destacam-se os fungos (Tabela 1):

Tabela 1 – Enzimas comercializadas produzidas por fungos

FUNGO PRODUTOR	ENZIMAS COMERCIAIS
<i>Aspergillus aculeatus</i>	β -glucanase, pectinase
<i>Aspergillus melleus</i>	protease
<i>Aspergillus niger</i>	aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidade, catalase, celulase, fitase, β -glutanasase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease, xinalase
<i>Aspergillus oryzae</i>	Aminopeptidase, α -amilase, lactase, protease
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	pectinase
<i>Chaetomium erraticum</i>	dextranase
<i>Penicillium camembertii</i>	lipase
<i>Penicillium citrinum</i>	irotease

<i>Penicillium funiculosum</i>	pactinase, xilanase
<i>Penicillium lilacinum</i>	dextranase
<i>Penicillium roqueforti</i>	lipase

Fonte: Orlandelli *et al.*, 2012.

1.2.1 Proteases

Dentre as diversas enzimas fúngicas, pode-se destacar as proteases, (também conhecidas como peptidases, proteinases e enzimas proteolíticas) que possuem uma grande aplicabilidade para a indústria. Essas são o grupo de enzimas hidrolíticas responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas e pertencem ao grupo considerado um dos mais importantes industrialmente devido a sua ampla diversidade de aplicação (WERNECK, 2016). Dos mais de US\$3 bilhões que o mercado mundial de enzimas movimentam 60% correspondem as proteases.

São utilizadas em diversos segmentos, tais como as indústrias alimentícia (para a produção de biscoitos, transformação de leite em queijo através da coagulação), têxtil (produção de lã, seda e couro), cosmética (renovação celular através da retirada da queratina) e farmacêutica (desenvolvimento de agentes terapêuticos eficazes, como a busca por coagulantes sanguíneos) (AZEVEDO, 2018).

1.3 Resistência microbiana e a busca por novos antimicrobianos

A resistência microbiana é um problema de saúde pública associado a diversos fatores e fasciculado entre os sistemas de saúde de todo o mundo, sendo a resistência bacteriana segundo a World Economic Forum Global Risks listada como uma das grandes ameaças à saúde humana (BLAIR *et al.*, 2014).

Cerca de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos medicamentos utilizados no combate a elas. Tal fator contribui para uma ineficácia no tratamento, além de constituir em prejuízo econômico na saúde, pois devido a essa limitação de opções, o uso de drogas que são mais tóxicas ao organismo humano se faz necessária (NEILL, 2014; INDRANINGRAT *et al.*, 2016). Estudos mostram que a capacidade de uma bactéria patogênica se tornar resistente a um medicamento é bem mais rápida do que a da indústria farmacêutica de produzir um novo antimicrobiano (MOTA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de novos antibióticos está atrelado ao desafio de combater tais microrganismos super-resistentes, bem como possuir amplo espectro de ação mais seguro, potente e pontual. A exploração de novos antibióticos naturais é um desafio que demanda tempo e elevados custos, e a indústria farmacêutica tem em grande parte abandonado estes compostos em favor do grande número de moléculas sintéticas já conhecidas e descritas na literatura (WRIGHT, 2014). Porém, os antibióticos naturais produzidos por microrganismos possuem algumas características que fazem a busca dessas moléculas necessária. São moléculas originais, com uma imensa diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas. (WITTING; SÜSSMUTH, 2011; WRIGHT, 2014).

Sabendo da grande biodiversidade fúngica existente, faz-se necessária a bioprospecção que, de um modo geral, tem por objetivo a busca por compostos orgânicos provenientes de microrganismos, animais e plantas que sejam úteis para a humanidade (ASTOLFI FILHO *et al.*, 2014).

Com isso destaca-se a prospecção biotecnológica, a partir da diversidade fúngica, de novos compostos com atividade antimicrobiana, que tem sido uma das principais áreas estudadas atualmente no mundo, devido entre outros fatores, ao uso irracional de medicamentos, levando ao crescimento de bactérias multirresistentes e a falta de drogas para combater tais agentes patogênicos (ABREU *et al.*, 2015; CLEMENTINO *et al.*, 2015).

1.4 Antimicrobianos de origem fúngica

A grande descoberta dos antimicrobianos data-se a partir de 1928, quando Alexander Fleming observou que um fungo, em placa de Petri, “acidentalmente” estava produzindo uma substância capaz de matar uma bactéria. Após isolada a substância, produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, ficou conhecida como penicilina, sendo um marco inicial para o desenvolvimento de outros antimicrobianos (LIMA, 2016).

Após quase uma década, em 1941, Howard Florey e Ernst Chain, isolaram a penicilina e investigaram as suas propriedades biológicas, com isso foi muito utilizada na II Guerra Mundial como um potente agente antimicrobiano (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014). A partir da descoberta da penicilina, muitas classes de fungos que

produzem substâncias de interesse passaram a ser estudadas (SELIM, 2012; VANDERLINDE & ONOFRE, 2010), como as penicilinas, as cefalosporinas, pleuromutilinas e o ácido fusídico (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

Diante disso, os fungos provenientes de países de clima tropical e subtropical como o Brasil, tem sido fonte para a produção de compostos naturais com atividade biológica importantes para a humanidade, devido à grande diversidade de moléculas produzidas por eles e provenientes do metabolismo primário e secundário (TEIXEIRA *et al.*, 2011; CELESTINO *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2014; ABREU *et al.*, 2015).

Dentre os diversos tipos de fungos, os filamentosos destacam-se por disponibilizarem produtos importantes para a humanidade e o ambiente, com propriedades eficientes para a produção de alimentos, na indústria farmacológica, cosmética, além da reciclagem de compostos da biosfera (ABREU *et al.*, 2015). Nesse sentido, as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são consideradas de grande importância biotecnológica, por serem produtoras de diversos compostos naturais com ação biológica e, com isso, dentre os demais gêneros, se destacam como sendo os comercialmente viáveis (ABREU *et al.*, 2015; LIMA, 2016; SILVA, 2017;)).

Estima-se que 23.000 produtos microbianos bioativos já foram isolados e desse total, 42% são produzidos por fungos. São conhecidos cerca de 6.500 compostos bioativos de origem microbiana, sendo que 30% destes provem dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (CLEMENTINO *et al.*, 2015).

Considerando a grande necessidade de novas pesquisas sobre a busca de biomoléculas bioativas, a biodiversidade de fungos ocorrentes na região amazônica e a possibilidade de se obter novos bioprodutos oriundos de fungos muito comuns nos ecossistemas terrestres da Amazônia, essa pesquisa tem como objetivo a busca por biomoléculas bioativas com ação antimicrobiana provenientes dos extratos brutos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., além de determinar suas classes químicas e avaliar a produção de proteases pelos fungos promissores.

A literatura ainda é vaga a respeito da biodiversidade fúngica na região amazônica, uma vez que temos uma área de floresta muito extensa, geograficamente se torna inviável a coleta em determinadas áreas, fazendo com que muitos pesquisadores acabem não dando continuidade em seus trabalhos, sendo necessário muitos estudos para

preencher as lacunas de conhecimento existentes. Além disso, o trabalho visa também a ampliação dos conhecimentos relacionados a esses gêneros para a Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, tais como a saber se os mesmos possuem atividade antimicrobiana, quais os microrganismos que esses fungos são capazes de inibir, quais as menores concentrações que tais fungos atuam, as prováveis classes químicas responsáveis por essa inibição, bem como a atividade proteolítica de tais gêneros.

Portanto, este projeto apresenta potencial para o desenvolvimento tecnológico, uma vez que seus produtos naturais são de grande relevância para a obtenção e desenvolvimento biotecnológico de novos fármacos, visando a prospecção de metabólitos primários e secundários biologicamente ativos com ação enzimática e antimicrobiana a partir de fungos da região amazônica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a produção de compostos antimicrobianos e proteases de culturas de *Aspergillus* e *Penicillium* estocados na Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM-Fiocruz).

2.2 Específicos

- Avaliar a capacidade dos extratos fúngicos em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos;

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos que apresentarem atividade antimicrobiana;

- Determinar as classes químicas das moléculas presentes nos extratos fúngicos promissores;

- Avaliar a produção de proteases extracelulares das culturas fúngicas promissoras;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do estudo

O trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório multiusuário em saúde/Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ Amazônia e Escola Superior de Ciências da Saúde – ESA/UEA.

3.2 Microrganismos

Para este estudo foram utilizadas 100 culturas de fungos, sendo 50 do gênero *Aspergillus* e 50 de *Penicillium* (Tabela 2), preservadas em água destilada e estocadas na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM, do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ.

3.3 Reativação e identificação em nível de gênero dos fungos filamentosos

O processo de reativação e a autenticação das culturas foi realizado de acordo com literatura especializada (RIFAI, 1969; PITT, 1985; KLICH & PITT, 1988). O meio de cultura utilizado foi Ágar Extrato de Malte (MEA), onde as culturas foram incubadas em BOD à 28°C durante 7 dias.

3.4 Extração dos biocompostos com atividade antimicrobiana

As culturas de *Aspergillus* e *Penicillium* viáveis foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer contendo meio Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES), a 28 °C, e após sete dias de incubação foi feita a extração a frio dos biocompostos em 200 mL de Acetato de Etila. Os extratos obtidos após 48 horas de extração foram filtrados e submetidos à concentração em Rotaevaporador e redissolvidos com o mesmo solvente extrativo para determinação da atividade antimicrobiana (SILVA *et al*, 2010).

3.5 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de “cup plate” por difusão em ágar

Os biocompostos extraídos no item 4.4. foram testados contra levedura e bactérias Gram-positiva e Gram-negativa: *Candida albicans* CFAM 1186, *Staphylococcus aureus* CBAM 0324 e *Escherichia coli* CBAM 0002, respectivamente. A levedura foi semeada

em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud durante 48 horas a 28 °C, enquanto as bactérias foram semeadas em ágar Mueller Hinton a 37 °C por 24 horas, ambas com o padrão de turbidez de acordo com a Escala de Mcfarland n° 1. Como padrão foi utilizado um disco central com Itraconazol e Cloranfenicol, sendo o primeiro para a levedura e o segundo para as bactérias (MERCK, Alemanha, 20 mg/mL). O extrato fúngico (20 mg/mL) foi adicionado em três poços equidistantes e a atividade antimicrobiana foi avaliada medindo-se o diâmetro do halo de inibição (mm) (SILVA *et al.*, 2010).

3.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo

A determinação da CIM foi realizada com todas as culturas fúngicas que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de *cup plate* (item 4.5). Em microplacas estéreis de 96 orifícios foram adicionados 100 µL de meio de cultura líquido (caldo) sendo utilizados os meios Sabouraud (para a levedura) e Mueller Hinton (para as bactérias) em todos os orifícios. Na linha A da placa foram adicionadas 100 µL dos extratos fúngicos a serem analisados na concentração de 20 mg/mL. Em seguida, com uma pipeta de microdiluição de 12 canais, foram feitas as diluições seriadas, transferindo-se 100 µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até a linha F da placa, sendo a linha G reservada para o solvente utilizado para solubilizar as amostras (DMSO- controle negativo), e a linha H, mantida sem extratos fúngicos, utilizando o cloranfenicol (20 mg/mL) para bactérias e o itraconazol (20 mg/mL) para os fungos como controle positivo.

Posteriormente foram inoculados 25 µL da suspensão celular de cada microrganismo tomando como base a densidade da coluna n°1 da escala de MacFarland e 25 µL de cloreto de trifeniltetrazolium 1,0% (MERCK®) como solução indicadora em cada um dos orifícios da placa.

As placas foram seladas e incubadas a 28 e 37 °C, para levedura e bactérias, respectivamente. Após o período de incubação a leitura foi realizada verificando-se o crescimento do microrganismo, indicado pela cor vermelha, e inibição, indicada pela ausência da cor vermelha. A CIM foi determinada como a menor concentração do extrato fúngico capaz de impedir o crescimento celular. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.7 Análise cromatográfica dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Com a cromatografia é possível a separação das moléculas provenientes do extrato bruto. Logo, para a determinação do perfil cromatográfico dos extratos promissores, ou seja, daqueles que apresentaram melhor desempenho no CIM com concentração igual ou inferior a 0,312 ug/mL, foram analisados por placas de CCD em sílica gel 60G (MERCK®) (SILVA, 2010).

As placas foram desenvolvidas em sistema de eluição adequado e a revelação dos biocompostos foi realizada através de reveladores físicos, químicos e biológicos para identificação dos metabólitos secundários e os respectivos Fatores de Retenção (Rf). O Rf é a função do eluente (solvente) e da fase estacionária usada, esses fatores foram determinados nas bandas com atividades biológicas visualizadas. O cálculo do Rf se deu através da razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente.

3.7.1 Revelação das cromatoplas por reveladores físicos

Para a revelação das cromatoplas utilizando reveladores físicos, as mesmas foram observadas sob luz ultravioleta de 365 e 254 nm para determinadas classes de metabólitos secundários. Os respectivos Rf foram determinados nas manchas com atividades biológicas visualizadas.

3.7.2 Revelação das cromatoplas por reveladores químicos

Já para a revelação utilizando reveladores químicos, foram utilizados os reagentes Dragendorff (responsável por revelar alcalóides, compostos nitrogenados heterocíclicos e amins quaternárias – *apresentando manchas de coloração alaranjada*), Cloreto Férrico (revela substâncias fenólicas – *com manchas azuladas*), Aminoetilfenilborato a 1% em etanol (NP) e polietilenoglicol a 5% em etanol (PEG) (revela flavonoides – *com manchas amareladas*) (SANTOS; SCHRIPEMA; KUSTER, 2005) e Anisaldeído-sulfúrico (revelador universal).

3.7.3 Revelação das cromatoplasmas por bioautografia

Para a revelação por bioautografia, em condições assépticas, foram utilizados 20 mL (Ágar Mueller Hinton ou Ágar Sabouraud), mantidos a 40 °C contendo 500 µL de suspensão celular de cada microrganismo testado e 500 µL de cloreto de trifeniltetrazolium - TCC 1% p/v, que foram vertidos nas cromatoplasmas acondicionadas em placa de Petri. As placas foram incubadas a 28 °C e 37 °C por 24 e 48 h, respectivamente, para a levedura e as bactérias. A atividade antimicrobiana foi avaliada visualizando-se a área de inibição (SILVA *et al.*, 2010).

3.8 Avaliação qualitativa da produção de proteases

O cultivo dos fungos selecionados nas etapas anteriores foi realizado em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) e incubados em BOD a 28°C por 7 dias. Após o crescimento fúngico, seis fragmentos de 1 cm de diâmetro de cada cultura foram inoculados em Erlenmeyers contendo 50 mL de solução Manachini, e mantidos a 150 rpm, por 5 dias a 28°C. Os cultivos foram realizados em duplicata.

Ao término do cultivo o caldo fermentado foi separado da biomassa foi filtração à vácuo e a avaliação da atividade enzimática qualitativa foi realizada através do método de *cup plate*. Foram feitas três perfurações circulares (5 mm) em placa de Petri contendo 20 mL de meio específico para verificar a produção de proteases (Tabela 2).

Protease – Ágar Gelatina Leite	
Solução 1	
Ágar	18g
Tampão Citrato Fosfato (pH 5,0)	900 mL
Solução 2	
Gelatina	10g
Tampão Citrato Fosfato (pH 5,0)	50 mL
Solução 3	
Leite desnatado	10g
Tampão Citrato Fosfato (pH 5,0)	50 mL

Tabela 2 – Meios de cultivo para determinação da atividade enzimática

Em cada poço foram inoculados 100 µL da amostra enzimática no meio de cultura e as placas foram incubadas em BOD a 37°C por 48 horas. A observação da formação de halos de hidrólise translúcidos se deu 24 e 48h após incubação. A atividade enzimática foi avaliada pela medição do diâmetro do halo (mm) de hidrólise no verso da placa, com o auxílio de uma régua para se determinar o Índice de Atividade enzimática (I), conforme Lima (2006), dado pela fórmula abaixo:

$$I = \text{diâmetro do halo (mm)} / \text{diâmetro do poço (mm)}$$

Para considerar um microrganismo produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, o valor do Índice de atividade enzimática (I) deve ser maior ou igual a 2,0 (SOARES *et al.*, 2010).

3.9 Avaliação quantitativa da produção de proteases

A atividade quantitativa foi determinada utilizando a metodologia descrita por Leighton *et al.*, (1973). Foram adicionados 0,25 mL de amostra enzimática em tubo Falcon já contendo 0,25 mL de substrato (azocaseína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2). Após 60 minutos de incubação a temperatura ambiente, na ausência de luz, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos à 4° C. Foram retirados 0,8 mL do sobrenadante e adicionados em 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. A leitura foi realizada a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1 em uma hora. Todas as análises foram preparadas em duplicata.

3.10 Análise estatística da produção de proteases

Os resultados experimentais foram expressos como média ± erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para determinar a significância das diferenças observadas nas amostras, ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reativação das culturas selecionadas

No processo de reativação as culturas selecionadas apresentaram-se viáveis, preservando as características macro e micromorfológicas. As 100 culturas puras, 50 *Aspergillus* e 50 *Penicillium*, estão dispostas na Tabela 3.

1	<i>P. purpurogenum</i> p01	26	<i>P. citrinum</i> p17	51	<i>A. flavus</i> a16	76	<i>A. clavatus</i> a29
2	<i>A. sydowii</i> a01	27	<i>Penicillium</i> sp. p18	52	<i>A. subolivaceo</i> a17	77	<i>Aspergillus</i> sp. a30
3	<i>A. candidus</i> a02	28	<i>Penicillium</i> sp. p19	53	<i>A. flavus</i> a18	78	<i>Penicillium</i> sp. p48
4	<i>A. caespitosos</i> a03	29	<i>P. citrinum</i> p20	54	<i>A. oryzae</i> a19	79	<i>A. japonicus</i> a31
5	<i>Penicillium</i> sp. p02	30	<i>Penicillium</i> sp. p21	55	<i>A. flavipes</i> a20	80	<i>A. flavus</i> a32
6	<i>P. steckii</i> p03	31	<i>A. pseudonomius</i> a10	56	<i>P. citrinum</i> p36	81	<i>Aspergillus</i> sp. a33
7	<i>A. awamori</i> a04	32	<i>A. flavus</i> a11	57	<i>Penicillium</i> sp. p37	82	<i>A. niger</i> a34
8	<i>A. oryzae</i> a05	33	<i>P. citrinum</i> p22	58	<i>P. citrinum</i> p38	83	<i>A. aculeatus</i> a35
9	<i>A. oryzae</i> a06	34	<i>P. fellutanum</i> p23	59	<i>P. decumbens</i> p39	84	<i>A. flavus</i> a36
10	<i>P. janthinellum</i> p04	35	<i>Penicillium</i> sp. p24	60	<i>A. niger</i> a21	85	<i>A. niger</i> a37
11	<i>P. citrinum</i> p05	36	<i>P. fellutanum</i> p25	61	<i>P. citrinum</i> p40	86	<i>A. oryzae</i> a38
12	<i>A. oryzae</i> a07	37	<i>Penicillium</i> sp. p26	62	<i>Penicillium</i> sp. p41	87	<i>Penicillium</i> sp. p49
13	<i>Aspergillus</i> sp. a08	38	<i>A. niger</i> a12	63	<i>Penicillium</i> sp. p42	88	<i>Aspergillus</i> sp. a39
14	<i>P. fellutanum</i> p06	39	<i>P. fellutanum</i> p27	64	<i>Penicillium</i> sp. p43	89	<i>A. flavus</i> a40
15	<i>P. fellutanum</i> p07	40	<i>P. fellutanum</i> p28	65	<i>A. flavus</i> a22	90	<i>A. flavus</i> a41
16	<i>P. fellutanum</i> p08	41	<i>P. purpurogenum</i> p29	66	<i>A. oryzae</i> a23	91	<i>Aspergillus</i> sp. a42
17	<i>P. waksmani</i> p09	42	<i>A. flavus</i> a13	67	<i>A. flavus</i> a24	92	<i>A. flavus</i> a43
18	<i>P. spinulosum</i> p10	43	<i>P. citrinum</i> p30	68	<i>Penicillium</i> sp. p44	93	<i>A. flavus</i> a44
19	<i>Penicillium</i> sp. p11	44	<i>A. aculeatus</i> a14	69	<i>Penicillium</i> sp. p45	94	<i>A. amoenus</i> a45
20	<i>Penicillium</i> sp. p12	45	<i>A. niger</i> a15	70	<i>P. citrinum</i> p46	95	<i>A. awamorii</i> a46
21	<i>P. citrinum</i> p13	46	<i>P. citrinum</i> p31	71	<i>Aspergillus</i> sp. a25	96	<i>A. niger</i> a47
22	<i>A. flavus-furcatis</i> a09	47	<i>Penicillium</i> sp. p32	72	<i>Penicillium</i> sp. p47	97	<i>A. giganteus</i> a48
23	<i>P. lividum</i> p14	48	<i>P. citrinum</i> p33	73	<i>A. niger</i> a26	98	<i>P. rubens</i> p50
24	<i>P. citreonigrum</i> p15	49	<i>Penicillium</i> sp. p34	74	<i>A. flavus</i> a27	99	<i>A. aculeatus</i> a49
25	<i>P. citrinum</i> p16	50	<i>P. citrinum</i> p35	75	<i>A. aculeatus</i> a28	100	<i>A. aculeatus</i> a50

Tabela 3 - Culturas fúngicas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* preservadas em água destilada.

Atividade antimicrobiana

Pela técnica de *cup plate*, verificou-se que 64% (n=64) dos extratos fúngicos apresentaram atividade positiva para pelo menos um microrganismo testado. Dos 50 extratos do gênero *Aspergillus* e 50 do gênero *Penicillium*, 78% (n=39) e 50% (n=25), respectivamente, inibiram o crescimento de pelo menos um dos microrganismos teste, com halos de inibição variando de 2 a 30 mm de diâmetro.

Vale ressaltar que destes, 10 extratos foram capazes de inibir o crescimento dos três microrganismos testados, sendo todos pertencentes ao gênero *Aspergillus*: *A. candidus* a02, *A. oryzae* a05, *A. flavus* a11, *A. oryzae* a23, *A. flavus* a27, *A. flavus* a32, *Aspergillus sp.* a39, *Aspergillus sp.* a42, *A. flavus* a44 e *A. giganteus* a48 (Tabela 4).

Em relação aos extratos de *Penicillium*, apenas 4% (n=2) apresentaram atividade antimicrobiana positiva contra a *C. albicans*, mas nenhum contra *E. coli*, entretanto 48% (n=24) inibiram o crescimento da *S. aureus* (Tabela 4).

No trabalho de Clementino e colaboradores (2015), dos 72 fungos endofíticos filamentosos coletados no Bioma Caatinga, 57 (79%) extratos apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que apenas quatro tiveram ação contra *E. coli*, os demais inibiram *S. aureus*. Essa prevalência pela inibição de *S. aureus* também é possível notar no presente estudo. Uma vez que os extratos apresentaram ações inibitórias mais promissoras contra bactérias gram-positivas, tal resultado pode ser atribuído em razão de que os metabólitos que foram produzidos pelos fungos com atividade antimicrobiana sejam mais eficazes contra bactérias Gram-positivas tendo em vista que sua parede celular é mais “acessível” que a das bactérias Gram-negativas, que são dotadas de uma membrana externa à sua parede celular, dificultando ainda mais a ação de certos antibióticos.

ITEM	Linhagem Fúngica (CFAM)	Halos de Inibição (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1	<i>P. purpurogenum</i> p01	-	5	-
2	<i>A. sydowii</i> a01	-	5	-
3	<i>A. candidus</i> a02	7	9	7,5
4	<i>A. caespitosos</i> a03	-	-	-
5	<i>Penicillium sp.</i> p02	-	-	-
6	<i>P. steckii</i> p03	-	3	-
7	<i>A. awamori</i> a04	-	-	-
8	<i>A. oryzae</i> a05	4	5	11
9	<i>A. oryzae</i> a06	-	-	-
10	<i>P. janthinellum</i> p04	-	-	-
11	<i>P. citrinum</i> p05	-	-	-
12	<i>A. oryzae</i> a07	-	8	-
13	<i>Aspergillus sp.</i> a08	-	-	-
14	<i>P. fellutanum</i> p06	-	-	-
15	<i>P. fellutanum</i> p07	-	8	5
16	<i>P. fellutanum</i> p08	-	5	-
17	<i>P. waksmani</i> p09	-	10	-
18	<i>P. spinulosum</i> p10	-	-	-
19	<i>Penicillium sp.</i> p11	-	5	-
20	<i>Penicillium sp.</i> p12	-	-	-
21	<i>P. citrinum</i> p13	-	5	-
22	<i>A. flavus-furcatis</i> a09	-	-	13
23	<i>P. lividum</i> p14	-	-	-
24	<i>P. citreonigrum</i> p15	-	7	-
25	<i>P. citrinum</i> p16	-	8	-
26	<i>P. citrinum</i> p17	-	10	-
27	<i>Penicillium sp.</i> p18	-	-	-
28	<i>Penicillium sp.</i> p19	-	-	-
29	<i>P. citrinum</i> p20	-	14	-
30	<i>Penicillium sp.</i> p21	-	-	-
31	<i>A. pseudonomius</i> a10	14	10	-
32	<i>A. flavus</i> a11	4	10	10,5
33	<i>P. citrinum</i> p22	-	8	-
34	<i>P. fellutanum</i> p23	-	-	-
35	<i>Penicillium sp.</i> p24	-	-	-
36	<i>P. fellutanum</i> p25	-	7	-
37	<i>Penicillium sp.</i> p26	-	-	-
38	<i>A. niger</i> a12	-	-	-
39	<i>P. fellutanum</i> p27	-	-	5
40	<i>P. fellutanum</i> p28	-	4	-
41	<i>P. purpurogenum</i> p29	-	10	-
42	<i>A. flavus</i> a13	-	5	9,8
43	<i>P. citrinum</i> p30	-	5	-
44	<i>A. aculeatus</i> a14	-	-	3,2
45	<i>A. niger</i> a15	-	-	-
46	<i>P. citrinum</i> p31	-	5	-

47	<i>Penicillium sp.</i> p32	-	-	-
48	<i>P. citrinum</i> p33	-	7	-
49	<i>Penicillium sp.</i> p34	-	4	-
50	<i>P. citrinum</i> p35	-	4	-
51	<i>A. flavus</i> a16	-	5	-
52	<i>A. subolivaceo</i> a17	-	-	-
53	<i>A. flavus</i> a18	-	10	-
54	<i>A. oryzae</i> a19	-	5	-
55	<i>A. flavipes</i> a20	-	5	-
56	<i>P. citrinum</i> p36	-	5	-
57	<i>Penicillium sp.</i> p37	-	-	-
58	<i>P. citrinum</i> p38	-	30	-
59	<i>P. decumbens</i> p39	-	-	-
60	<i>A. niger</i> a21	-	-	4,8
61	<i>P. citrinum</i> p40	-	8	-
62	<i>Penicillium sp.</i> p41	-	-	-
63	<i>Penicillium sp.</i> p42	-	-	-
64	<i>Penicillium sp.</i> p43	-	-	-
65	<i>A. flavus</i> a22	-	10	8
66	<i>A. oryzae</i> a23	5	7,5	5,5
67	<i>A. flavus</i> a24	-	-	-
68	<i>Penicillium sp.</i> p44	-	-	-
69	<i>Penicillium sp.</i> p45	-	-	-
70	<i>P. citrinum</i> p46	-	5	-
71	<i>Aspergillus sp.</i> a25	-	8	8
72	<i>Penicillium sp.</i> p47	-	-	-
73	<i>A. niger</i> a26	-	4	9
74	<i>A. flavus</i> a27	5	4	10
75	<i>A. aculeatus</i> a28	-	-	7,5
76	<i>A. clavatus</i> a29	-	-	8,3
77	<i>Aspergillus sp.</i> a30	-	-	-
78	<i>Penicillium sp.</i> p48	-	-	-
79	<i>A. japonicus</i> a31	-	10	-
80	<i>A. flavus</i> a32	7	8	9,3
81	<i>Aspergillus sp.</i> a33	-	3,5	-
82	<i>A. niger</i> a34	-	4	11
83	<i>A. aculeatus</i> a35	-	-	6,3
84	<i>A. flavus</i> a36	-	5	-
85	<i>A. niger</i> a37	-	-	-
86	<i>A. oryzae</i> a38	-	-	10,5
87	<i>Penicillium sp.</i> p49	-	-	-
88	<i>Aspergillus sp.</i> a39	5	4	9,5
89	<i>A. flavus</i> a40	-	-	-
90	<i>A. flavus</i> a41	-	2	10
91	<i>Aspergillus sp.</i> a42	4	5	11,3
92	<i>A. flavus</i> a43	-	-	8,8
93	<i>A. flavus</i> a44	10	10	15
94	<i>A. amoenus</i> a45	-	12	-

95	<i>A. awamorii</i> a46	-	9,3	-
96	<i>A. niger</i> a47	-	10	-
97	<i>A. giganteus</i> a48	9	7	8
98	<i>P. rubens</i> p50	-	-	-
99	<i>A. aculeatus</i> a49	-	-	6
100	<i>A. aculeatus</i> a50	-	17	-

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana dos extratos de *Aspergillus* e *Penicillium* pelo método do “cup plate” com os halos de inibição em mm.

No trabalho desenvolvido por Neto e colaboradores (2017), também foi possível verificar que seus extratos fúngicos do gênero *Penicillium* também comprovam atividade contra *S. aureus*, corroborando com os dados do presente estudo. Entretanto, os extratos fúngicos do gênero *Penicillium* não apresentaram formação de halos de inibição contra *E.coli*, divergindo do que foi encontrado no trabalho de Silva (2008), sugerindo assim que haja diferença no mecanismo microbiano de cada espécie (NETO *et al.*, 2017). Além disso, de maneira geral em seu estudo observou-se a formação de halos de inibição com valores superiores aos encontrados no presente estudo para as espécies desse gênero, com exceção do *P. citrinum* p38 que apresentou halo de 30 mm.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Pela técnica de microdiluição em caldo, verificou-se que dentre todos os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana positiva contra pelo menos um microrganismo no teste de *cup plate*, aproximadamente 24% (n=15) apresentaram atividade nas menores concentrações do estudo (0,156 e 0,312 mg/mL de CIM) contra os microrganismos, tendo como destaque o extrato de *A. pseudonomius* a10 que foi o único a apresentar a menor concentração, de 0,156 mg/mL para inibição de *E. coli*, os demais extratos tiveram CIM de 0,312 mg/mL. Todos os menores valores de CIM destacados em negrito na Tabela 5.

Em um trabalho realizado em solo do cerrado mineiro, também com estudos de fungos filamentosos incluindo espécies do gênero *Penicillium*, notou-se que a CIM de tais extratos fúngicos foi maior do que a obtida no presente estudo, onde a CIM encontrada foi de 2 mg/mL, enquanto que no presente estudo foram encontrados valores entre 0,156 e 0,312 mg/mL (MOREIRA, 2009).

Também, em um trabalho desenvolvido por Vanderline & Onofre (2010), quanto ao estudo dos metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* contra *S. aureus*, foi possível verificar valores de CIM superiores, de 6,25% de concentração, divergindo do que foi encontrado no presente estudo.

Tendo em vista tais resultados, as amostras apresentaram valores de CIM com atividade antimicrobiana com alta inibição, mostrando um forte potencial para pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas contra bactérias multirresistentes.

ITEM	Linhagem Fúngica (CFAM)	Valores de CIM (mg/mL)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1	<i>P. purpurogenum</i> p01	-	10	-
2	<i>A. sydowii</i> a01	-	0,625	-
3	<i>A. candidus</i> a02	5	5	5
4	<i>P. steckii</i> p03	-	0,312	-
5	<i>A. oryzae</i> a05	10	1,25	2,5
6	<i>A. oryzae.</i> a07	-	10	-
7	<i>P. fellutanum</i> p07	-	0,312	2,5
8	<i>P. fellutanum</i> p08	-	10	-
9	<i>P. waksmanii</i> p09	-	10	-
10	<i>Penicillium sp.</i> p11	-	10	-
11	<i>P. citrinum</i> p13	-	10	-
12	<i>A. flavus-furcatis</i> a09	-	-	2,5
13	<i>P. citreonigrum</i> p15	-	0,312	-
14	<i>P. citrinum</i> p16	-	10	-
15	<i>P. citrinum</i> p17	-	10	-
16	<i>P. citrinum</i> p20	-	10	-
17	<i>A. pseudonomius</i> a10	0,156	5	-
18	<i>A. flavus</i> a11	0,312	5	2,5
19	<i>P. citrinum</i> p22	-	10	-
20	<i>P. fellutanum</i> p25	-	10	-
21	<i>P. fellutanum</i> p27	-	-	2,5
22	<i>P. fellutanum</i> p28	-	0,312	-
23	<i>P. purpurogenum</i> p29	-	2,5	-
24	<i>A. flavus</i> a13	-	0,312	2,5
25	<i>P. citrinum</i> p30	-	2,5	-
26	<i>A. aculeatus</i> a14	-	-	0,312
27	<i>P. citrinum</i> p31	-	2,5	-
28	<i>P. citrinum</i> p33	-	10	-
29	<i>Penicillium sp.</i> p34	-	5	-
30	<i>P. citrinum</i> p35	-	10	-
31	<i>A. flavus</i> a16	-	10	-
32	<i>A. flavus</i> a18	-	5	-

33	<i>A. oryzae</i> a19	-	2,5	-
34	<i>A. flavipes</i> a20	-	10	-
35	<i>P. citrinum</i> p36	-	10	-
36	<i>P. citrinum</i> p38	-	0,312	-
37	<i>A. niger</i> a21	-	-	10
38	<i>P. citrinum</i> p40	-	10	-
39	<i>A. flavus</i> a22	-	10	5
40	<i>A. oryzae</i> a23	10	5	5
41	<i>P. citrinum</i> p46	-	10	-
42	<i>Aspergillus sp.</i> a25	-	1,25	5
43	<i>A. niger</i> a26	-	2,5	5
44	<i>A. flavus</i> a27	0,312	0,312	5
45	<i>A. aculeatus</i> a28	-	-	0,625
46	<i>A. clavatus</i> a29	-	-	10
47	<i>A. japonicus</i> a31	-	2,5	-
48	<i>A. flavus</i> a32	10	0,312	2,5
49	<i>Aspergillus sp.</i> a33	-	2,5	-
50	<i>A. niger</i> a34	-	5	0,625
51	<i>A. aculeatus</i> a35	-	-	0,625
52	<i>A. flavus</i> a36	-	0,312	-
53	<i>A. oryzae</i> a38	-	-	10
54	<i>Aspergillus sp.</i> a39	2,5	0,625	0,625
55	<i>A. flavus</i> a41	-	0,312	5
56	<i>Aspergillus sp.</i> a42	0,625	0,625	0,625
57	<i>A. flavus</i> a43	-	-	2,5
58	<i>A. flavus</i> a44	0,625	1,25	2,5
59	<i>A. amoenus</i> a45	-	10	-
60	<i>A. awamori</i> a46	10	0,312	-
61	<i>A. niger</i> a47	-	0,312	-
62	<i>A. giganteus</i> a48	10	0,625	0,625
63	<i>A. aculeatus</i> a49	-	-	0,625
64	<i>A. aculeatus</i> a50	-	2,5	-

Tabela 5 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Em negrito se encontram os menores valores de CIM.

Análise cromatográfica dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise cromatográfica foi realizada com 14 (Tabela 6) dos 15 extratos promissores provenientes da CIM devido a perda de uma cultura por contaminação, não apresentando viabilidade nas tentativas de purificação.

O sistema de eluição utilizado foi o Clorofórmio-Metanol na proporção de 8:1, pois somente neste sistema se obteve uma melhor definição e maior quantidade de bandas visualizadas. A partir da visualização das bandas foi possível calcular os respectivos RF.

ITEM	Linhagem Fúngica (CFAM)	Rf Total	Rf com atividade	Revelador	Cor	Sugestão de classe
01	<i>P. steckii</i> p03	12	Rf 8 – 0,63 (<i>S. aureus</i>)	Anisaldeído	Roxo	Terpenos
02	<i>P. fellutanum</i> p07	6	Rf 1 – 0,09	Anisaldeído Cloreto Férrico	Amarelo	Flavonoides
			Rf 6 – 0,79 (<i>S. aureus</i>)	NP/PEG Nenhum	Azul -	Alcaloides e cumarinas -
03	<i>P. citreonigrum</i> p15			Não teve RF com atividade		
04	<i>A. pseudonomius</i> a10	5	Rf 4 * (<i>E. coli</i>)	Dragendorff NP/PEG	Laranja Azul	Alcaloides Alcaloides e cumarinas
			Rf 3 * (<i>S. aureus</i>)	UV 365 nm NP/PEG	Azul Azul	Alcaloides e cumarinas Alcaloides e cumarinas
05	<i>A. japonicus</i> a11	6	Rf 1 – 0,36 (<i>E. coli</i>)	UV 254 nm UV 365 nm	Azul Amarelo	Alcaloides e cumarinas Flavonoides
			Rf 2 – 0,40 (<i>S. aureus</i>)	Dragendorff Sulfato Cérico	Laranja Lilás	Alcaloides Terpenos
06	<i>A. flavus</i> a13	4	Rf 4* (<i>S. aureus</i>)	Anisaldeído Cloreto Férrico	Lilás Vermelho	Terpenos Fenólicos
07	<i>A. aculeatus</i> a14			Não teve RF com atividade		
08	<i>P. citrinum</i> p38	7	Rf 6 – 0,84 (<i>S. aureus</i>)	Dragendorff	Laranja	Alcaloides
09	<i>A. flavus</i> a27	5	Rf 1 – 0,34 (<i>E. coli</i>)	UV 254 nm Dragendorff	Azul Laranja	Alcaloides e cumarinas Alcaloides
			Rf 3 – 0,40 (<i>S. aureus</i>)	Sulfato Cérico Cloreto Férrico	Lilás Vermelho	Terpenos Fenólicos
10	<i>A. flavus</i> a32	8	Rf 3 – 0,34 (<i>E. coli</i>)	UV 254 nm Sulfato Cérico Cloreto Férrico	Azul Lilás Vermelho	Alcaloides e cumarinas Terpenos Fenólicos
			Rf 4 – 0,43 (<i>S. aureus</i>)	NP/PEG Dragendorff	Azul Laranja	Alcaloides e cumarinas Alcaloides
11	<i>A. flavus</i> a36	7	Rf 3 – 0,38 (<i>S. aureus</i>)	Cloreto Férrico NP/PEG	Vermelho Azul	Fenólicos Alcaloides e Cumarinas
12	<i>A. flavus</i> a41	8	Rf 2 – 0,34 (<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>)	UV 254 nm Dragendorff Sulfato Cérico	Azul Laranja Lilás	Alcaloides e Cumarinas Alcaloides Terpenos
13	<i>A. awamori</i> a46			Não teve RF com atividade		
14	<i>A. niger</i> a47	8	Rf 2 – 0,37 (<i>S. aureus</i>)	Sulfato Cérico	Lilás	Terpenos

Tabela 6 – Fatores de Retenção (RF) com atividade encontrados. (*) Valores de Rf não calculados devido a problemas na obtenção do extrato.

Pode ser visualizado abaixo algumas das bandas de amostra com atividade e seus respectivos reveladores os quais permitiram a sugestão das prováveis classes químicas com ação antimicrobiana (Figura 5):

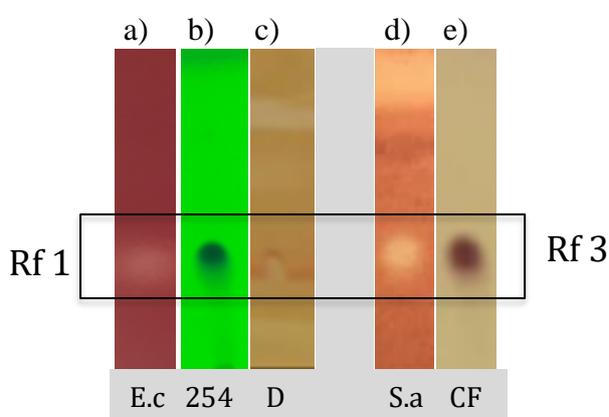


Figura 5 – *A. flavus* a27 com Rf 1 para atividade contra *E. coli* (a) sendo revelado através de Luz UV 254 nm (b) e dragendorff (c) e, Rf 3 com atividade contra *S. aureus* (d) sendo revelado por cloreto férrico (e).

Nos cromatogramas revelados por luz UV de 254 e 365 nm, todos os extratos apresentaram fluorescência, indicando assim, que possuem ligações duplas (segundo a revelação de luz UV 254 nm) e duplas conjugadas (revelação em luz UV 365 nm), assemelhando-se à estudos recentes de OLIVEIRA (2018) que trabalhou com identificação do perfil químico de 21 espécies de fungos endofíticos, e destacou que todos os seus extratos apresentavam fluorescência nos dois comprimentos de onda, luz UV de 254 e 365 nm.

De maneira geral, não considerando apenas as bandas com atividade biológica, foram encontrados nos extratos uma maior quantidade de bandas sugestivas das classes dos terpenos, seguido das cumarinas, compostos fenólicos, alcaloides e, por fim, flavonoides (Tabela 7). Os resultados corroboram com o estudo de Oliveira (2018) quanto à sugestão de moléculas da classe dos terpenos, onde em seu trabalho com fungos endofíticos, sugere-se que grande parte dos extratos pertencem a essa classe, indicando assim que os terpenos estão bem distribuídos nos fungos. Já no trabalho realizado por Silva (2017), também com fungos endofíticos é evidenciada a ampla distribuição de

outras classes químicas nos fungos, destacando em seus resultados os flavonoides e fenólicos, que também podem ser visualizados no presente estudo.

Terpenos, flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos são classes químicas bastante procuradas por pesquisadores por apresentarem diversas atividades farmacológicas como as atividades antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, hormonal, dentre outras (SANTOS e RODRIGUES, 2017; SILVA, 2017; OLIVEIRA, 2018).

Com isso, os extratos se mostraram promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, apresentando moléculas com grande variedade de classes químicas como os terpenos, fenólicos, cumarinas, alcaloides e flavonoides, que são classes já conhecidas por serem produtoras de antimicrobianos, entretanto como perspectivas futuras, faz-se necessário o desenvolvimento de outras técnicas para a melhor elucidação de tais compostos.

Sugestão das classes químicas encontradas nos Rfs dos extratos					
ITEM	Alcaloides	Terpenos	Compostos Fenólicos	Flavonoides	Cumarinas
1	-	+	-	+	-
2	-	+	-	+	-
3	+	+	-	+	+
4	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+
6	-	+	+	-	-
7	-	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	-	+
10	+	+	+	-	+
11	+	+	+	-	+
12	-	+	+	-	+
13	-	+	-	-	-
14	-	-	+	-	+
Total	7	13	8	6	10

Tabela 7 – Caracterização química das bandas encontradas nos extratos com ou sem atividade biológica

Avaliação qualitativa da produção de proteases

A avaliação qualitativa da produção de enzimas foi realizada com 10 dos 14 fungos utilizados na CCD devido à perda de 4 culturas por contaminação, não apresentando-se viáveis nas tentativas de purificação. Os fungos utilizados foram: *P.*

steckii p03, *P. fellutanum* p07, *P. citreonigrum* p15, *A. flavus* a11, *A. flavus* a13, *A. aculeatus* a14, *A. flavus* a27, *A. flavus* a32, *A. flavus* a36 e *A. flavus* a41.

Após o período de 24h de incubação, oito (80%) das 10 amostras enzimáticas apresentaram atividade (Tabela 8). O menor índice enzimático encontrado nas primeiras 24h foi da amostra de *A. flavus* a13 com $I = 2,5$ já o maior índice foi encontrado na amostra *A. flavus* a32, com $I = 3,21$ (Figura 6). Após o período de 48 horas de incubação das 10 amostras enzimáticas, apenas um não apresentou atividade (Tabela 9), tendo portanto 90% dos fungos com produção proteolítica. O menor índice encontrado nesse período foi da amostra de *A. aculeatus* a14 com $I = 2,21$ (que nas primeiras 24h não apresentou produção enzimática, ou seja, não formou halo) e o maior foi de *A. flavus* a32 com $I = 4,11$.



Figura 6 - Halo de hidrólise da amostra de *A. flavus* a32 após 24 horas.

Com isso, tais fungos podem ser considerados produtores de enzimas extracelulares em meio sólido, nesse caso proteases, uma vez que apresentaram $I > 2,0$ (SOARES *et al.*, 2010).

ITEM	Linhagem Fúngica (CFAM)	Índice Enzimático (I) 24h	Índice Enzimático (I) 48h	Desvio Padrão
1	<i>P. steckii</i> p03	2,56	3,25	0,49
2	<i>P. fellutanum</i> p07	2,73	3,41	0,48
3	<i>P. citreonigrum</i> p15	0,00	0,00	0,00
4	<i>A. flavus</i> a11	2,75	3,70	0,67
5	<i>A. flavus</i> a13	2,5	3,22	0,51
6	<i>A. aculeatus</i> a14	0,00	2,21	1,56
7	<i>A. flavus</i> a27	2,5	3,07	0,40

8	<i>A. flavus</i> a32	3,21	4,11	0,64
9	<i>A. flavus</i> a36	2,7	3,63	0,66
10	<i>A. flavus</i> a41	2,56	3,26	0,49

Tabela 8 – Análise qualitativa, Índice enzimático (I) das amostras em 24 e 48h

Em um estudo com fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado realizado por Werneck (2016), dos 58 isolados fúngicos, apenas 36 formaram halo de hidrólise em meio de cultura contendo caseína, no período de 24h. Sendo assim, em seu trabalho houve 62,07% de produção proteolítica, divergindo do que foi encontrado nesse estudo onde a produção no mesmo período de 24h foi de 80%. Além disso, no trabalho citado não foi estabelecido um valor mínimo de halo para considerar essa produção, divergindo do presente estudo, onde foi estabelecido o $I > 2$ para se considerar um fungo produtor de enzimas proteolíticas.

No estudo de Chamy (2017), com a identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares, dos 14 fungos que foram analisados para a atividade proteolítica, apenas 3 (21,42%) obtiveram resultados positivos para a produção de proteases, com $I > 2$, tendo destaque para a cepa CCA1 que após o período de 36h obteve $I = 5,46$, superior ao que foi encontrado no presente estudo.

Avaliação quantitativa da produção de proteases

A avaliação quantitativa da produção de proteases foi realizada com as mesmas amostras enzimáticas que passaram pela atividade qualitativa. Das dez amostras, duas apresentaram os maiores valores de atividade, sendo estas as amostras de *P. steckii* p03, *P. fellutanum* p07 e *A. flavus* a32, com valores acima de 70 U/mL (Tabela 9).

No estudo de Werneck (2016), dos 33 fungos que formaram halo para a produção de protease, o maior valor de atividade encontrado em sua análise quantitativa foi de 41 U/mL, divergindo do que foi encontrado no presente estudo. Já no trabalho de Azevedo (2018) com 200 fungos isolados do solo amazônico, 11 se destacaram, produzindo atividade proteolítica superior a 50 U/mL, destacando os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* com $I = 97$ e $I = 54$ U/mL, respectivamente. Nesse ponto destaca-se o gênero *Aspergillus* que apresentou índices satisfatórios de atividade enzimática também no presente estudo.

No trabalho de Chamy (2017), dos 3 fungos com atividade proteolítica, a cepa CCA1 ganhou destaque com atividade igual a 186 U/mL. Tais estudos comprovam que os fungos, de maneira geral, são bons produtores de enzimas de interesse industrial.

ITEM	AMOSTRA (CFAM)	Atividade proteolítica (U/mL)	Desvio Padrão
1	<i>P. steckii</i> p03	72,00	3,36
2	<i>P. fellutanum</i> p07	153,33	1,68
3	<i>P. citreonigrum</i> p15	2,00	0,00
4	<i>A. flavus</i> a11	31,33	0,67
5	<i>A. flavus</i> a13	17,33	2,91
6	<i>A. aculeatus</i> a14	16,67	2,14
7	<i>A. flavus</i> a27	37,33	2,69
8	<i>A. flavus</i> a32	93,33	0,38
9	<i>A. flavus</i> a36	26,67	0,67
10	<i>A. flavus</i> a41	19,33	1,76

Tabela 9 – Atividade proteolítica (U/mL) de linhagens de *Aspergillus*.

5. CONCLUSÃO

Foi possível verificar que os extratos fúngicos apresentam capacidade para a inibição de microrganismos patogênicos, tendo uma prevalência pelas bactérias Gram-positivas. As amostras apresentaram valores de CIM com atividade antimicrobiana com alta inibição, evidenciando potencial para pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas contra bactérias resistentes.

Os extratos apresentaram moléculas com grande variedade de classes químicas como os terpenos, fenólicos, cumarinas, alcaloides e flavonoides, que são classes já conhecidas por serem produtoras de antimicrobianos, contribuindo assim com a caracterização química do acervo das espécies de fungos do gênero *Aspergillus* da CFAM.

Quanto a produção de proteases, os filtrados obtiveram resultados que comprovam que são bons produtores e obtiveram bom desempenho com os valores de atividade proteolítica, sendo necessário estudos mais aprofundados para a caracterização de tais proteases.

De maneira geral, os fungos estudados apresentaram potencial atividade tanto para antimicrobianos quanto para a produção de proteases, contribuindo para a melhor caracterização das espécies fúngicas da região Amazônica, especificamente os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como para o avanço no setor biotecnológico.

Como perspectivas futuras, faz-se necessário o uso de outros métodos químicos para a melhor separação e purificação das moléculas com atividades biológicas presentes nos extratos.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, J.A.S; ROVIDA, A.F.S; PAMPHILE, J. A. Fungi of Interest: Biotechnological Applications. **Revista UNINGÁ Review**. v.21, n.1, pp. 55-59. 2015.

ASTOLFI FILHO, Spartaco; NUNES SILVA, Carlos Gustavo; BIGI, Maria de Fátima Mendes Acácio. **Bioprospecção e Biotecnologia**. Parc. Estrat. Brasília - DF. v. 19, n. 38, p. 45-80, jan-jun 2014.

AZEVEDO, T.O.M. **Produção e caracterização de proteases de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica**. 2018. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

BLAIR, J.M; WEBBER, M.A; BAYLAY, A.J; OGBOLU, D.O; PIDDOCK, L.J.V. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v. 13, p. 4251. 2014.

BRAKHAGE AA, SCHROECKH V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology** 48: 15–22. 2011.

CELESTINO, J.R; CARVALHO, L.E; LIMA, M.P; LIMA, A.M; OGUSKO, M.M; SOUZA, J.V.B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Processes Biochemistry**. v. 49, p. 569-675. 2014.

CHAMY, M.N.C.L. **Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758)**. 2017. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Coari.

CHENG, G; DAI, M; AHMED, S; HAO, H; WANG, X; YUAN, Z. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 470. 2016.

CLEMENTINO, L.C; BARBOSA, C.C; SILVA, F.D; QUEIROZ, J.C.F. Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga. **Evidência**, Joaçaba v. 15, n. 1, p. 37-56, jan/jun. 2015.

FERNANDES, D. R. L. **Avaliação biotecnológica de fungos endofíticos de macaúba e cana-de-açúcar para produção de enzimas, atividade antimicrobiana, citotóxica e tripanocida**. 2016.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research** 111, 509 – 547. 2007.

INDRANINGRAT, A.A.G; SMIDT, H; SIPKEMA, D. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. **Marine. Drugs**. v. 14, n. 87, p. 1-66. 2016.

KLICH, M.A; PITT, J.I. A Laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, Australia. 116p. 1988.

LEIGHTON, T.J.; DOI, R. H.; WARREN, R.A. J.; KELLN, R. A. **The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis***. J. Mol. Biol., (76) 103-122. 1973.

LIMA, A. R. S. **Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases**. Araluce Regina de Souza Lima: UFAM, 85p. il.2006. MANAUS

LIMA, R. M. DE. **Bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos do solo amazônico com ação frente as principais bactérias multiresistentes**. 2016. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

LOTFY, M.M. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, *in press*. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.02.002>. 2018.

MORAES, A.M.L DE.; PAES, R. DE A.; HOLANDA, V. L. DE. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde: Capítulo 4 – Micologia**. v. 4. Rio de Janeiro, EPSJV, IOC, 2009. p. 399-496.

MORAIS, J.F; YOSHIMOTO, M; RHODEN, S.A; PAMPHILE, J.A. Bioprospecção de Microrganismos Produtores de Compostos Bioativos com Atividade Antitumoral. **Revista UNIGÁ Review**, v.17, n.1, pp.27-34. 2014.

MOREIRA, B. T. **Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais. 2009.

MOTA, R.A; SILVA, K.P.C; FREITAS, M.F.L; PORTO, W.J.N; SILVA, L.B.Z. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição para a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470. 2005.

MOURA, C.M.R. DA. **Produção de tanase por amostras de *Penicillium* spp. isoladas do semi-árido do estado de Pernambuco, utilizando meios contendo resíduos agroindustriais.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco. Pernambuco. 2018.

NETO, V.F.M; LIMA, M. da S; NUNES, A.P.R; TEIXEIRA, R.H.F; SILVA, R.H.F. 2017. Ação antimicrobiana de extratos produzidos a partir de fungos filamentosos contra *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Revista Brasileira de Agrotecnologia** (BRASIL), v. 7, n. 2. ISSN: 2317-3114. pp, 198-202.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. **Review on Antimicrobial Resistance**. Available online: <http://amr-review.org/Publications> (accessed on 15 outubro 2016). 2014.

OLIVEIRA, J. **Bioprospecção de alcaloides em extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae).** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2018.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. SaBios: **Rev. Saúde e Biol**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

PITT, J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Sydney. **CSIRO Division of Food Processing**. 1985.

RAPER, K.B. & FENELL, D.I. **The genus *Aspergillus*.** Malabar, Robert and Krieger Malabar. 1977.

RIFAI, M. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, London, n.116, p.1-116. 1969.

SANTOS, P; SCHRIPEMA, J; KUSTER, R. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. **Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão.** v. 7, n. 3, p. 29-35. 2017.

SELIM, K.A; EL-BEIH, A.A; ABDEL-RAHMAN, T.M; EL-DIWANY, A.I. Biology of Endophytic Fungi. **Current Research in Environment & Applied Mycology.** Doi 10.5943/cream/2/1/3. 2012.

SILVA, J.C. da. **Perfil da viabilidade celular e atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* do acervo da coleção de culturas DPUA.** 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2008.

SILVA, J.C; FERNANDES, O.C.C; MARTINS, M.S; RODRIGUES, J.R.A.C; TEIXEIRA, M.F.S. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Rev. de la Socied. Venez. de Microb.** 30: 48-54. 2010.

SILVA, M. **Fungos endofíticos associados à *Passiflora incarnata* e avaliação de seu potencial biotecnológico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2017.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L.; BARONI, S. **Identificação do potencial aminolíticos de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*.** Cienc. Tecnol. Aliment. [online]. 2010, v. 30, n. 3, p. 700-705.

SOUZA, E.B.A DE; COUTINHO, V. DA S. Contaminação por fungos (*Aspergillus*) em alimentos destinados ao consumo humano e outros animais. **Saber Científico**, Porto Velho, V., N., P. 2018.

TEIXEIRA, M.F.S; SILVA, T.A; PALHETA, R.A; CARNEIRO, A.L.B; ATAYDE, H.M. **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas).** EDUA, Manaus. 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VANDERLINDE, D.G; ONOFRE, S.B. Atividade Antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus: Fries) MURRILL. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 11-16 - ISSN 1983-1870. 2010.

WERNECK, G. C. **Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado**. Brasília. 2016. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília.

WITTING K, SÜSSMUTH RD. Discovery of antibacterials and other bioactive compounds from microorganisms-evaluating methodologies for discovery and generation of non-ribosomal peptide antibiotics. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 11, 1547-1559, 2011.

WRIGHT GD. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 147-154, 2014.

WRIGHT, P. M.; SEIPLE, I. B.; MYERS, A. G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840–8869, 2014.