



Universidade
Estadual de Goiás

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

ÁDRIAN BRITO BARTOLOMEU

**Análise dos metabólitos secundários de isolados de
trichoderma em células CALU-3 e em *Pseudomonas
aeruginosa***

**Anápolis - GO
2022**

ÁDRIAN BRITO BARTOLOMEU

Análise dos metabólitos secundários de isolados de trichoderma em células CALU-3 e em *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strico Sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientadora: Prof^a Dra Valdirene Neves Monteiro.

**Anápolis - GO
2022**

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BB292 Bartolomeu, Ádrian
a Análise dos metabólitos secundários de isolados de
Trichoderma em células CALU-3 e em Pseudomonas
aeruginosa / Ádrian Bartolomeu; orientador Valdirene
Neves Monteiro . -- Anápolis, 2022.
62 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos
para Saúde) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET,
Universidade Estadual de Goiás, 2022.

1. Trichoderma spp. 2. Moléculas bioativas . 3.
Formação de Biofilme . I. Neves Monteiro , Valdirene ,
orient. II. Título.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.
Dados do autor (a)

Nome Completo: Ádrian Brito Bartolomeu

E-mail: adrianbritob@hotmail.com

Dados do trabalho

Título: Análise de metabólitos secundários de isolados de Trichoderma em células CALU-3 e em *Pseudomonas aeruginosa*

Tipo

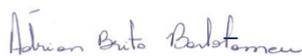
() Tese (x) Dissertação

Curso/Programa: Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde

Concorda com a liberação documento SIM NÃO¹

Anápolis ,02/12/2022

Local Data



Assinatura do autor (a)

Documento assinado digitalmente



VALDIRENE NEVES MONTEIRO

Data: 06/01/2023 14:12:25-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Assinatura do orientador (a)

¹Casos de impedimento:

- Período de embargo é de um ano a partir da data de defesa
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

SERVIÇO PÚBLICO ESTADUAL UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
HENRIQUE SANTILLO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 062

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO - No dia segundo de dezembro de 2022, às 14h, reuniram-se os componentes da banca Examinadora: Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro – Orientadora, Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg e Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, sob a presidência da primeira, e em sessão realizada por videoconferência. Procederam à avaliação da defesa de dissertação de Mestrado intitulada: **“Análise dos metabólitos secundários de isolados de Trichoderma em células CALU-3 e em Pseudomonas aeruginosa”** de autoria de Ádrian Brito Bartolomeu, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora: Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida à autora da dissertação **Ádrian Brito Bartolomeu** que, em 30 minutos procedeu à apresentação do trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. A dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE, na área de concentração “Pesquisa e Obtenção de Produtos para Saúde”, na linha de pesquisa- “Monitoramento de Produtos para a Saúde” pela Universidade Estadual de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCAPS, da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 horas e 06 minutos, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de Mestrado e para constar eu, Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro, presidente da banca, lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.



Profa. Dra Raphaela de Castro Georg
Membro externo - UFG



Documento assinado digitalmente
PLINIO LAZARO FALEIRO NAVES
Data: 10/12/2022 12:56:07-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves
Membro interno - UEG



Documento assinado digitalmente
VALDIRENE NEVES MONTEIRO
Data: 10/12/2022 13:09:47-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dr. Valdirene Neves Monteiro
Membro interno - UEG

Dedicatória

À todos aqueles de alguma forma, seja ela direta ou indiretamente lutaram comigo por este sonho.

Dedico este trabalho aos meus pais Anilton e Divina, por todo incentivo amoroso e financeiro.

Aos meus irmãos Ester e Isaque, por sempre me ensinarem a levar a vida com bom humor e muito carinho.

À Mikarla por seu companheirismo e paciência nos momentos de crise.

Aos meus tios, em especial José Amilton e Imaculada, Arilene e Anderson, Adailson vulgo Caçula e Áurea e meu querido tio Ailton.

Aos meus Avós Pedro e Nazaré, em especial ao meu avô que me ensinou que não existe idade para continuar a usar as palavras para trazer vida.

À professora Valdirene Monteiro Neves, por sua generosidade e sabedoria que me fizeram refletir e amadurecer.

Ao professor Plínio por seu suporte e paciência.

Agradecimentos

Aos que seguem, meu sincero e profundo agradecimento.

A Deus por me capacitar e dar sentido a minha existência.

Aos meus pais, minha mãe Divina, como já dizia meu pai “Divina tú sempre serás Divina”, seu companherismo, coragem, amor e humor foram essenciais para que eu conseguisse continuar. Pai, a você agradeço todo cuidado e dedicação, além da atenção aos detalhes comigo durante a minha trajetória, obrigada por me ensinar que a vida se muda com estudo e muito trabalho.

Aos meus irmãos Ester e Isaque, agradeço todo amor e carinho, por sempre me lembrarem o motivo de continuar e por tornarem a minha vida mais leve e feliz.

À Mikarla, sua paciência, parceria e amor, que foram fundamentais, principalmente em momentos em que me sentia só e desesperançosa, obrigada por me ajudar a lidar com minhas ansiedades e continuar firme em meus objetivos.

Aos meus tios, tia Imaculada, agradeço por todo carinho, cuidado, risadas e instrução sobre a verdade que é Jesus, em especial agradeço ao tio José Amilton por me ensinar o que é ser humano, amigo e verdadeiro. Espero que um dia as pessoas ao meu redor sintam a paz e verdade que sinto quando estou perto do senhor.

Aos meus tios Arilene e Anderson agradeço, o carinho e todo apoio financeiro, tia Arilene obrigada por me lembrar que não há limites para quem tem ideias.

Ao meu tio Ailton, te agradeço por investir em mim e acreditar juntamente comigo que existe mais para se viver e conquistar.

Ao meu tio Adailson (Caçula), te agradeço por não medir esforços quando precisei, em se preocupar com minha trajetória e por me ensinar a viver e a sonhar, à Áurea agradeço todo o legado que você nos dá dia a dia com quem você é.

Aos meus primos/irmãos: Jéssica obrigada por todo companherismo e humor sou muito abençoada por te ter em minha vida, Joyce obrigada por seu amparo psicológico e ao Júnior por todo seu cuidado e amor.

À minha família do coração Leo e Wesley, por todo carinho e incentivo.

Ao Fabrício, que é o pastor mais legal que eu conheço, tão amoroso e paciente por diversas vezes ouviu minhas angústias quanto ao futuro e me ajudou a ter fé e acreditar mais em mim, você é 10 “Fá”, espero que Deus abençoe muito você e sua linda família, sou eternamente grata por seu suporte.

Aos meus colegas de laboratório: Amanda, você é tão preciosa, amorosa, generosa e paciente te agradeço por todo carinho. Aline por toda sua sagacidade e paciência, à Juliane e Milena por suas parcerias quando trabalhamos juntas, e ao Osvaldo por toda sua instrução, além de não me esquecer dos alunos de iniciação científica Hugo e Tayná, meu muito obrigada à todos.

Agradeço ao professor Plínio por me ensinar a ser humana, humilde e paciente, além de toda sua parceria nos testes em laboratório.

Agradeço a professora Valdirene por me ensinar a continuar, a não esquecer minhas prioridades, por compartilhar seu conhecimento, suportar minhas dificuldades e pela dedicação neste projeto.

Agradeço ao professor Thiago Ribeiro por todo o suporte e incentivo em embarcar neste caminho de vida acadêmica.

À Universidade Estadual de Goiás, pela bolsa concedida.

Com isto, levo uma grande lição: Ninguém vence sozinho!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	18
2.2. FUNGOS COMO FERRAMENTAS PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	19
2.3. O GÊNERO TRICHODERMA.....	19
2.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	20
2.5. TÉCNICAS DE ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITO.....	21
2.6. TÉCNICAS DE BIOENSAIO.....	22
2.6.1 ENSAIOS DE LETALIDADE EM <i>Artemia salina</i>	22
2.6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	24
2.6.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	25
2.6.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE.....	26
2.6.5 BIOFILMES BACTERIANOS.....	26
2.6.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. OBJETIVO GERAL.....	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	32
4.2 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DOS ISOLADOS TRICHODERMA PARA PRODUÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	32
4.3 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DOS ISOLADOS DE TRICHODERMA.....	32
4.4 TESTE DE LETALIDADE EM ARTEMIA SALINA.....	33
4.5 ENSAIO BIOLÓGICO IN VITRO.....	35
4.5.1 CULTURAS DE LINHAGENS CALU-3.....	35
4.5.2 DETERMINAÇÕES DE CITOTOXICIDADE DOS METABÓLITOS DOS ISOLADOS DE TRICHODERMA PELA VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DO ENSAIO DE REDUÇÃO DE MTT.....	36
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
4.7 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME COM CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37

4.7.1 PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	38
4.7.2 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PELO ENSAIO DE LETALIDADE EM <i>Artemia salina</i>	42
5.2 AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE DOS EXTRATOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	45
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>P. aeruginosa</i> POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Trichoderma</i> <i>sp</i>	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	23
Figura 2. Reação do MTT com enzima mitocondrial redutase em células viáveis.	25
Figura 3. Os quatro estágios de formação de biofilme.....	28
Figura 4. Ciclo de síntese de biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figura 5. Extração dos metabólitos secundários.....	32
Figura 6. Ensaio em <i>Artemia salina</i>	35
Figura 7. Diluição dos metabólitos secundários em caldo TSB.....	37
Figura 8. Disposição dos compostos nas microplacas.....	39
Figura 9. Experimento ensaio de inibição de biofilme.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biomassas obtidas dos metabólitos secundários.....	33
Tabela 2. Avaliação de toxicidade em <i>Artemia Salina</i> de metabólitos secundários de fungos de espécies de <i>Trichoderma spp</i>	42
Tabela 3. Viabilidade celular referente a exposição dos metabólitos secundários do isolado 18 em 48 horas.....	45
Tabela 4. Índice e categoria de formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i>	46
Tabela 5. Resultados de formação de biofilme na presença de metabólitos secundários.....	47

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

° C – graus Celsius

μ - micro

As₂O₃ – Trióxido de Arsênio

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta eficiência

CLAE- EM/EM – Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada à Espectrometria de massas

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CO₂ – Dióxido de Carbono

CV – Controle de viabilidade

CNI – Controle não inoculado

CL₅₀ - Concentração letal média

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO – Densidade óptica

eDNA – DNA extracelular

ENDa – Endonucleases

EPS – Polímeros extracelulares

ESY – *Electrospray ionization*

FAB – *Fast Atomic Pumping*

FT – ICR – *Ion cyclotron resonance Fourier Transformer*

IT – íons *trap 3D*

K₂Cr₂O₂ – Dicromato de potássio

h - Horas

LIT – Liner

mg – miligramas

mL- mililitros

MALDI – *Ionization-assisted laser desorption matrix*

MTT – 3-(4,2- dimetil tiazol 2-il)2,5 difenil brometo tetrazólio

MYG – Meio sólido composto por extrato de malte, levedura, glicose e ágar

MYGP – Caldo composto por peptona, glicose, extrato de levedura e malte

Q – Quádrupolo

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

Pa – *Pseudomonas aeruginosa*

TOF – Flight time

UFC – Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

Fungos de espécie *Trichoderma* são altamente especializados em sobreviver de maneira simbiótica por meio de atividades endofíticas habitando o interior de tecidos vegetais. Além disto, estes micro-organismos produzem substâncias descritas como metabólitos secundários, que estão sendo materiais biológicos cada vez mais estudados, estas com o objetivo de serem obtidas substâncias de potencial biotecnológico, com atividade antibiofilme, citotóxicas entre outras. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar a análise de metabólitos secundários de isolados de *Trichoderma*. Para estas atividades, 10 espécies de *Trichoderma* denominados 18, T00, 57, 46, B102, AB302, AM201, AB107, S404 e ALL42, tiveram seus metabólitos secundários investigados. Com os ensaios de letalidade em *Artemia salina*, foi possível avaliar os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* com relevância na concentração letal média (CL₅₀) assim, dos dez metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma*, seis destes denominados 18, T00, 46, B102 e AM201 apresentaram toxicidade relevantes com CL₅₀. Porém, foram estipulados pelo autor um ponto de corte onde foram considerados os metabólitos dos isolados de *Trichoderma* que apresentaram CL₅₀ com concentração de até 100 µg.ml⁻¹ e assim, ficando de fora o isolados AM201. O isolado B102 apresentou elevada toxicidade também não sendo selecionado. Dessa forma, somente os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* denominados 18, T00 e 46 foram selecionados para os ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular pelo método de MTT e inibição de biofilmes de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados da viabilidade celular mostram que os metabólitos secundários dos isolados apresentaram uma diminuição entre 13 a 20%, mesmo não apresentando regularidade na diminuição da viabilidade entre as concentrações utilizadas em todos os metabólitos dos isolados. A atividade antibiofilme dos metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* contra a biofilmes produzidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* revelou que os metabólitos secundários dos três isolados utilizados (18, T00 e 46) foram muito eficientes naquelas cepas de *P. aeruginosa* categorizadas de acordo com a formação de biofilme como forte.

Palavras-chave: *Trichoderma* spp., Moléculas bioativas, Formação de biofilme.

ABSTRACT

Fungi of the *Trichoderma* species are highly specialized in surviving symbiotically through endophytic activities inhabiting the interior of plant tissues. In addition, these microorganisms have substances described as secondary metabolites, which are being increasingly detected as biological materials, with the aim of being substances of biotechnological potential, with antibiofilm, cytotoxic activity, among others. Therefore, this work aimed to carry out an analysis of secondary metabolites of *Trichoderma* isolates. For these activities, 10 *Trichoderma* species named 18, T00, 57, 46, B102, AB302, AM201, AB107, S404 and ALL42 had their secondary metabolites investigated. With the lethality assays in *Artemia salina*, it was possible to evaluate the secondary metabolites of the *Trichoderma* isolates with conversion into the mean lethal concentration (LC_{50}), thus, of the ten secondary metabolites of the *Trichoderma* isolates, six of which were named 18, T00, 46, B102 and AM201 adopted LC_{50} toxicity. However, the author, considering the metabolites of the *Trichoderma* isolates that demonstrated LC_{50} with a concentration of up to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, thus excluding the AM201 isolates, stipulated a cut-off point. Isolated B102 showed high toxicity and was not selected. Thus, only the secondary metabolites of the *Trichoderma* isolates called 18, T00 and 46 were selected for cytotoxicity or cell viability assays by the MTT method and evacuation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* strains. The results of cell viability show that the secondary metabolites of the isolates showed a decrease between 13 and 20%, even though there was no regularity in the reduction of viability between the concentrations used in all the metabolites of the isolates. The antibiofilm activity of the secondary metabolites of the *Trichoderma* isolates against the biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa* strains revealed that the secondary metabolites of the three isolates used (18, T00 and 46) were very efficient in those strains of *P. aeruginosa* categorized according to formation of biofilm as strong.

Keywords: *Trichoderma* spp., Bioactive molecules. Biofilm formation.

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos primários são materiais decorrentes de processos que envolvem uma diversidade de reações, estas anabólicas, catabólicas e anfibólicas, aos quais são mediadas por enzimas que propiciam materiais biossintéticos, juntamente com a energia e a conversão de materiais proteicos e lipídicos, onde estas atividades são essenciais para o cenário de sobrevivência de seus agentes, dispostas em quantidades equilibradas e não acumuláveis (DEMAIN e FANG, 2019).

Em contrapartida, os metabólitos secundários embora também sejam produtos de reações químicas do metabolismo, nem sempre estão envolvidos diretamente nos aspectos que se referem ao desenvolvimento e crescimento dos organismos aos quais pertence, porém a longo prazo podem sim interferir na sobrevivência de seus agentes (AGOSTINI-COSTA et al., 2019).

Portanto, quando se refere aos metabólitos secundários sabe-se que estes materiais são composições químicas que estão associadas a processos de sinalização, interação e desenvolvimento com outros tipos de organismos. A diversidade destes agentes são frutos da versatilidade genética do gênero de seus produtores, que diante de diferentes tipos de exposições a fatores ambientais conseguem desenvolver mecanismos onde suas proteínas receptoras reconhecem estes fatores e por meio de uma transducionalização de sinal podem reprimir ou ativar diferentes genes (ZEILINGER et al., 2016).

É conhecido que substâncias naturais, são extremamente diversificadas e sintetizados por algas, plantas, bactérias, animais e fungos. Sendo úteis no que se refere ao fornecimento de vantagens aos seus produtores, em aspectos de defesa metabólica, competição, disponibilidade de nutrientes e outros (AGOSTINI-COSTA et al., 2019; BREITLING et al., 2019).

Sobre produtores de metabólitos secundários destaca os fungos *Trichoderma spp.* como microrganismos altamente eficientes no que diz respeito a produção de metabólitos secundários, dando enfoque, inclusive a algumas destas substâncias como por exemplo: ácido harziânico, antraquinonas, azafilonas, butenolides, daucanas, tricholinas, glisopreninas, ácido heptelídico, pironas, entre outras, que em

sua maioria apresentam bons resultados nas atividades antibacterianas e antifúngicas (PAPHITOU, 2013).

O *Trichoderma*, tem sido um dos fungos filamentosos mais estudados, para o desenvolvimento e aplicabilidade de novos processos biotecnológicos em atividades industriais (PINTO et al., 2014).

Diante disto, por apresentar uma atividade metabólica favorável e ampla distribuição geográfica, estudos envolvendo os fungos da espécie *Trichoderma*, tem elucidado a investigação do seu potencial de uso na aplicação de bioprodutos (RAMADA et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017; DEBODE et al., 2018).

2. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Metabólitos secundários

Os microrganismos são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários que podem ser usados em diversas aplicações biotecnológicas especialmente as aplicações no campo da medicina o que representa uma importante fonte de compostos bioativos para saúde animal e humana, agroquímicos e farmacologia. Vários metabólitos secundários com diferentes estruturas e atividades biológicas estão sendo isolados de diferentes organismos e diversos estudos têm sido realizados para entender e caracterizar a via biossintética, levando à descoberta de novos compostos (COLLEMARE et al., 2008, CRANEY; AHMED; NODWELL, 2013).

Apresentam-se como moléculas químicas estruturalmente heterogêneas com baixo peso molecular as quais não se encontram envolvidas no crescimento do microorganismo, mas são produzidos quando grandes quantidades de precursores do metabolismo primário se encontram acumulados, como por exemplo, piruvato, aminoácidos entre outros (KELLER, 2005; BELINATO et al., 2019).

Como essas moléculas não constituem o esqueleto molecular básico, sua ausência não restringe a vida do microrganismo, porém, sua ausência pode comprometer sua sobrevivência podendo desencadear desvantagens à um grupo filogenético (THIRUMURUGAN et al. 2018).

A síntese de metabólitos secundários está relacionada com genes localizados em *clusters*, os quais possuem outros genes que codificam para enzimas biossintéticas, algumas proteínas reguladoras e resistência contra ação tóxica dos próprios metabólitos, o que evita ação tóxica contra as próprias espécies produtoras, além disto, estes materiais promovem a secreção dos metabólitos secundários (BRAKHAGE, 2013).

Yin et al. (2012) destacam que estes aglomerados gênicos, comuns em bactérias, fungos filamentosos e plantas, são modulados por estímulos ambientais tais como fonte de carbono, luz, pH entre outros, sendo relevantes para determinados grupos gênicos e que irão variar entre as espécies fúngicas.

Levando em consideração a diversidade de função, estrutura e biossíntese, os metabólitos secundários são classificados em cinco classes: terpenóides e esteroides, alcalóides, derivados de ácidos graxos e policetídeos, polipeptídeos não ribossomais e peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós traducionalmente (RiPPs) (O'CONNOR, 2010; MCINTOSH et al., 2011, SOLTANI, 2016, RISDIAN; MOZEF; WINK, 2019).

A produção de metabólitos secundários garante aos fungos vantagem em *habitats* no qual ele habita e no qual eles necessitam competir com outros micro-organismos sendo que, muitos desses metabólitos apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios em outros microrganismos (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ et al., 2018).

2.2 Fungos como ferramentas para produção de metabólitos secundários

O isolamento e a identificação de micro-organismos a partir de fontes naturais tem sido uma ferramenta atraente na obtenção de espécies aplicáveis e geneticamente estáveis. A bioprospecção de microrganismos permite a descoberta de espécies com potencial de patogenicidade e virulência podendo produzir uma gama de metabólitos secundários com funções importantes sendo explorados para aplicações como antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos entre outras aplicações (OSBOURN, 2010).

Fungos filamentosos possuem a habilidade de crescer em substratos simples e de baixo custo, bem como sua capacidade de produzir diversos metabólitos, com aplicações importantes na indústria farmacêutica como os antibióticos, agentes hipocolesterolemiantes, inibidores tumorais e imunossuppressores, ou ainda sua atuação na agricultura como micoparásita de patógenos de plantas e animais (KELLER et al., 2005; BRAKHAGE e SCHROECKH, 2010; MEYER, 2019).

2.3 O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* pertence à classe dos Sordariomycetes do filo *Ascomycota*, apresentando em torno de 250 espécies aceitas e identificadas dentro da filogenia molecular. Vivem sob matéria orgânica em decomposição e reproduzem de forma assexuada podendo ainda, colonizar plantas lenhosas e herbáceas, onde nestas situações, são encontrados em sua forma sexual teleomórfica (gênero *Hypocrea*) Outras cepas não possuem estágio sexual conhecido. Espécies de *Trichoderma* abrangem fungos que habitam os mais variados tipos de solo, possuindo crescimento rápido em meio de cultura, com micélio hialino e hifas

septadas, com conídios de diferentes formas e tamanhos, em diferentes tons de verde (HARMAN et al., 2004; MEYER et al., 2019; SILVA et al., 2019).

Embora os fungos sejam dependentes de fatores como temperatura, pH e umidade para o seu desenvolvimento, as espécies de *Trichoderma* são consideradas altamente versáteis e interessantes quando direcionadas para aplicações de desenvolvimento de materiais biológicos (NIETO-JACOBO et al., 2017).

Adnan e colaboradores (2019) relatam que existem 10 espécies destaques de *Trichoderma*, as quais são: *T. virens*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. viride*, *T. spirale*, *T. coningii*, *T. asperellum*, *T. ganense* e *T. hamatum*, sendo elas as mais estudadas e utilizadas em técnicas de isolamento, já que desde 1930 o impacto antagônico destes fungos são agentes de interesse de pesquisa científica, isto também por se saber que alguns dos mecanismos destes fungos são, antibiose, competição, predação, micoparasitismo e resistência a agentes patogênicos (RABUSKE, 2021).

As espécies de *Trichoderma* estão sendo consideradas como promissoras na produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e antiviral onde o *Trichoderma viride*, por exemplo, pode ser demonstrado como um dos agentes estudados para tais ações que sustentam importantes interesses a respeito dos mecanismos desencadeados pelos metabólitos secundários (AWAD et al., 2018).

2.4 Métodos de extração de metabólitos secundários

A extração de metabólitos objetiva aspectos tais como a liberação eficiente, remoção de interferentes e possibilitar a compatibilidade de técnicas analíticas subsequentes. É importante ter em mente que muitas variáveis podem interferir no rendimento da substância bioativa durante o processo de extração tendo como principais a concentração do solvente, a temperatura, o método e o tempo de extração levando a maiores ou menores concentrações das substâncias bioativas (ÁLVAREZ et al., 2010; GONG et al., 2017).

As extrações em amostras sólidas e líquidas diferem na metodologia de extração. Assim, em amostras sólidas, o protocolo mais utilizado para extração de metabólitos é a extração sólido-líquido na qual a extração consiste na separação de um ou mais componentes de uma mistura sólida por meio de um solvente líquido e para amostras líquidas são utilizadas as extrações líquido-líquido na qual os compostos dissolvidos ou suspensos em uma mistura líquida são separados de

outros compostos da mistura de acordo com suas propriedades físicas e químicas. Posteriormente, as amostras extraídas e preparadas são analisadas por técnicas como ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) ou cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) permitindo a detecção de um grande número de metabólitos secundários simultaneamente (ÁLVAREZ et al., 2010; GUMMER et al., 2012).

2.5 Técnicas de análises e identificação de metabólitos

As amostras extraídas e preparadas são analisadas por técnicas como ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) permitindo a detecção de um grande número de metabólitos secundários simultaneamente (GUMMER et al., 2012).

A Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massa (*Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry-GC/MS*), é uma técnica analítica que apresenta elevada resolução, robustez e reprodutibilidade e está entre as técnicas mais empregadas nos estudos de metabólitos secundários, sendo uma técnica híbrida, funciona em duas etapas: inicialmente atua separando componentes de uma mistura gasosa a ser analisada (GC) seguido da análise por espectrometria de massas (MS), possibilitando a identificação dos componentes químicos gasosos separados pelo GC (KRUGER et al., 2015).

A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas (LC-MS) possibilita analisar diversas substâncias por conta de uma variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, como a eluição em fase reversa com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica, e troca iônica com a separação dos componentes de uma mistura entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e um fluido que interage com a fase fixa, chamado fase móvel (ARDREY, 2003; MALVIYA, 2010).

A ressonância magnética nuclear (nuclear magnetic resonance-NMR) é uma técnica analítica muito na qual permite a identificação de rotina de novos compostos por ser abrangente, robusta, pouca ou nenhuma manipulação das amostras, podendo ser analisadas amostras biológicas intactas sólidas ou semi-sólidas, uso de pouca quantidade de amostra e não destrói a amostra após análise mesmo contaminadas com solventes deuterados (BELINATO et al., 2019).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*- FT-IR) é uma técnica analítica usada na obtenção de espectros na absorção no infravermelho ou emissão de sólido, líquido ou gás, coletando simultaneamente dados espectrais de alta resolução em uma ampla faixa espectral (BRIELLE E ARKIN, 2018).

Embora seja uma técnica menos utilizada em estudos de identificação de metabólitos secundários vem sendo utilizada pela potencial aplicação na elucidação da estrutura química de metabólitos secundários além de ser uma técnica de baixo custo, simples e não destrutiva (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011).

Os dados obtidos das análises de GC-MS e LC-MS e NMR precisam ser convertidos de modo que possam ser utilizados em outras etapas de análises pois, os dados gerados são abundantes e muito complexos necessitando de ferramentas adequadas e com isso minimizando erros na interpretação dos resultados e conservando a integridade das oscilações biológicas observadas (CANUTO et al., 2018; BELINATO et al., 2019).

2.6 Técnicas de Bioensaios

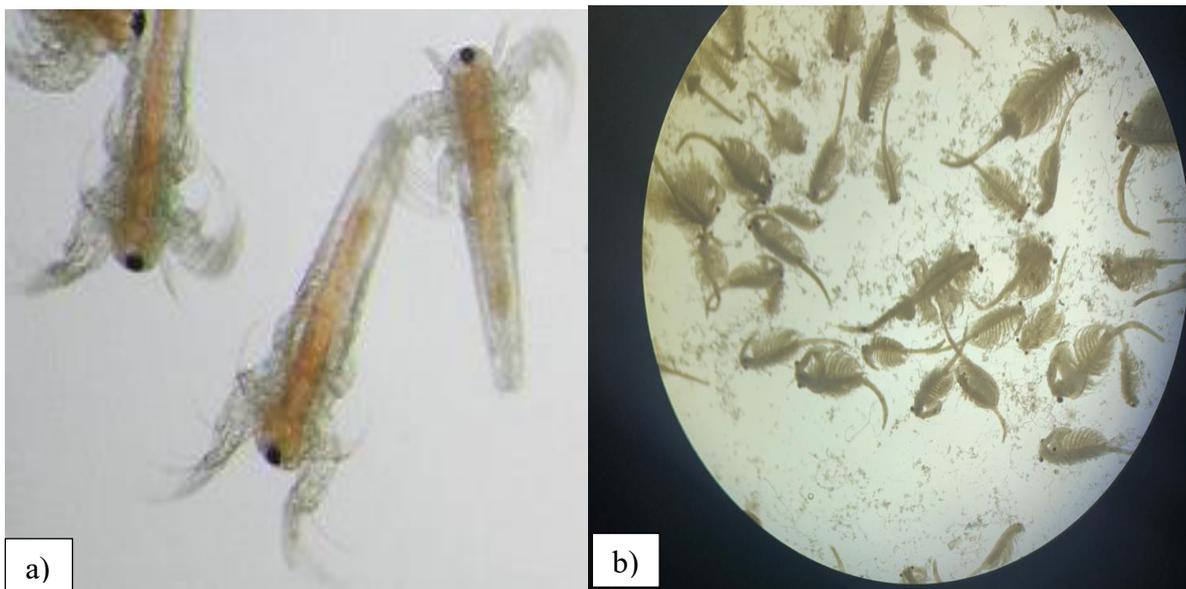
Bioensaios são testes de toxicidade realizados em laboratório que têm como objetivo determinar o grau ou efeito biológico de uma substância desconhecida ou de uma substância-teste (droga, hormônio, químicos, etc.), o qual é feito através de comparação experimental do efeito da substância testada com efeitos causados por uma substância conhecida, em uma cultura de células vivas ou em um organismo-teste. Estes ensaios diferem entre si, especialmente no que diz respeito ao tempo de exposição do organismo-teste ao agente que será testado (CHAPMAN, 2006).

2.6.1 Ensaios de letalidade com *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo pertencente a ordem Anostraca popularmente conhecida como camarão de salmoura, a qual é encontrada em águas salgadas fazendo parte do ciclo alimentar de peixes. A sua reprodução pode ser observada de duas formas, como cistos e náuplios (larvas), quando em cistos costumam apresentar um comprimento médio de 250 µm e estes são passíveis de armazenamento a seco, não sensíveis ao vácuo. Já quando são visualizados como náuplios, descreve-se como agentes recém-eclodidos com aproximadamente 450 µm de comprimento de acordo com a figura 1a. Ao chegar na fase adulta, a *Artemia*

pode vir a apresentar um comprimento de 10mm conforme visualizado na figura 1b (NASCIMENTO et al., 2013; IGARASHI, 2008; STAPPEN et al., 2019).

Figura 1. Microcrustáceo *Artemia salina*



a) Náuplios (larvas) recém-eclodidos b) Artemia em fase adulta.

Fonte: MILLÁN, 2021; Autoria própria.

Os ovos de *Artemia* podem ser facilmente encontrados em lojas de materiais aquáticos, e possuem a característica positiva de serem metabolicamente inativos quando não são eclodidos, o que os possibilita a sua conservação a vácuo por longos períodos em temperaturas amenas (IGARASHI, 2021).

Por vivenciarem um ciclo de vida curto e possuírem uma alta taxa de fecundidade através da eclosão de seus cistos, as *Artemias* são consideradas seres extremamente interessantes para estudos em laboratório. Além do mais, estes microcrustáceos são providos de grande habilidade no que se refere a manutenção de seu equilíbrio homeostático quando expostos elevadas variações de temperaturas como por exemplo de 6- 35° C (ARULVASU et al., 2014).

Amarouyache et al. (2017) relatam que *Artêmias* possuem ao menos três características que as proporcionam a capacidade de sobreviver em diferentes ambientes, a primeira delas está relacionada a habilidade destes organismos em gerenciarem os níveis de oxigênio mesmo em condições de alta salinidade, por meio da síntese de pigmentos próprios. Em seguida, a característica de formar cistos dormentes as permitem serem imunes a ambientes desfavoráveis, e por fim *Artemias*, no interior de seus órgãos detém boas quantidades de Na⁺/K-ATPase o que lhes é útil na expulsão de sal do meio interno para externo, ou seja este mecanismo único apresentado por estes agentes, é fundamental para defesa contra

possíveis predadores (CAMARGO, 2005; SAEZ et al., 2000; NTGUNGWE et al., 2020).

Além disto, a *Artemia* é vista como um agente de valor biológico, isto por ser eficaz em seu habitat quando se refere a redução de agentes poluentes flutuantes, e apresentar-se com aplicabilidade útil no desempenho de pesquisas em áreas como genética, biologia molecular, toxicologia, fisiologia e ecologia. Onde observa-se que a execução do ensaio de letalidade com o uso de *Artemia salina* é uma alternativa rápida, de baixo custo e de fácil manejo e manutenção no ambiente laboratorial, quando visa-se o objetivo de realizar testes de toxicidades (FERNANDES; GONÇALVES, 2016; VEIGA e VITAL, 2011).

Melo et al. (2020), acrescenta que o uso de *Artemias* é amplamente empregado nos estudos em laboratório devido a serem, agentes sensíveis a uma gama diversa de substâncias, expressando assim resultados de caráter toxicológico aos bioensaios e investigam compostos biológicos oriundos de produtos naturais.

Carvalho et al. (2017), desenvolveram alguns estudos a fim de aprimorar teste de toxicidade que são realizados com materiais oriundos de bactérias, fungos, vírus, plantas, agrotóxicos e outros. Para isto, os autores elucidaram o emprego da ferramenta estatística *Probit*, inserida no aplicativo computacional *Rstudio*, onde o R é descrito como uma linguagem computacional, que dispõe de ferramentas para a análise de dados estatísticos.

2.6.2 Avaliação da atividade citotóxica

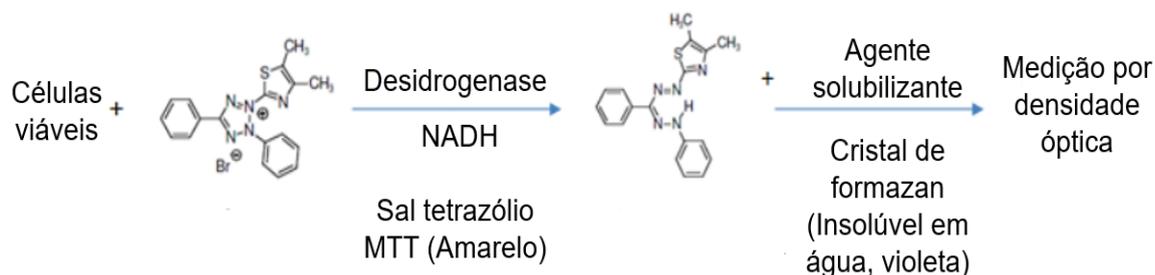
O ensaio colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5- dimetil tiazol 2-il) 2,5 difenil brometo tetrazólio (MTT), é uma técnica que permite a análise e monitoramento da proliferação de células cancerígenas, por meio da observação da viabilidade celular obtida através da atividade enzimática mitocondrial de células vivas. Para isto, efetua-se a diluição dos sais de tetrazólio em um controle positivo e um controle negativo. Neste ensaio a incubação das células é realizada a 37° C em bandejas de 96 poços por espaços de tempos variados, e ao final do período de incubação as placas são centrifugadas e o seu sobrenadante aspirado e descartado com o auxílio de uma pipeta. Na quantificação e leitura das amostras utiliza-se um espectrofotômetro para a análise dos resultados (MOSMANN, 1983; WANG et al., 2014).

As vantagens de desenvolver os estudos de citotoxicidade por meio de

ensaios colorimétricos (MTT), envolvem a rapidez da efetivação dos testes, a facilidade do manejo dos materiais, o custo, que é barato e a possibilidade de se processar grande número de amostras por meio do uso dos espectrômetros de varredura de múltiplos poços (leitores ELISA) (MOSMANN, 1983; WANG et al., 2014).

No desenvolvimento do ensaio de MTT trabalha-se a comprovação da citotoxicidade de um determinado composto, bioativo ou toxina, ao metabolismo celular de glicídeos de células pertencentes a linhagens específicas. Este processo ocorre por meio da avaliação das atividades da função mitocondrial das estruturas testadas, fator essencial para a funcionalidade celular. Além disso, neste ensaio realiza-se também a avaliação do potencial redox das enzimas desidrogenases mitocondriais (enzima mitocondrial redutase), e para que seja obtida a viabilidade celular, é quantificado a redução do MTT (sal solúvel em água, de coloração amarela) em formazan (sal insolúvel em água, de coloração roxa), processo que ocorre por meio da atividade metabólica relacionada ao NADH e NADHP (STODDART, 2011; MOSMANN, 1983; WANG et al., 2014). A figura 2 abaixo representa a reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase.

Figura 2. Reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase em células viáveis



Fonte: WANG et al., 2014; Adaptado pela autora.

2.6.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Determina-se, então, a menor quantidade necessária para a inibição do crescimento de um microrganismo-teste para medir a atividade antimicrobiana de um agente. Esta quantidade determinada é chamada concentração mínima inibitória (CMI), a qual é geralmente obtida pela preparação de uma série de tubos de cultura por meio da adição de uma concentração diferente do mesmo agente em cada um dos tubos, os quais são inoculados posteriormente. Segundo Andrews (2001), a menor concentração capaz de inibir o crescimento de micro-organismos é designada como 'padrão ouro', quando visa-se descrever as susceptibilidades dos organismos aos agentes antimicrobianos.

2.6.4 Teste de susceptibilidade

Os testes de susceptibilidade, ou sensibilidade, são geralmente realizados em quaisquer organismos responsáveis por um processo infeccioso que requeira terapia antimicrobiana quando não é possível prever a sensibilidade do organismo em questão, mesmo quando é possível identificá-lo. Este tipo de teste é mais indicado quando o organismo causador é de uma espécie capaz de resistir aos agentes microbianos normalmente empregados (ANVISA/NCCLS, 2003).

2.6.5 Biofilmes bacterianos

Freitas et al. (2010), descreve os biofilmes bacterianos como matrizes poliméricas extracelulares, que permanecem aderidas nas superfícies de sua origem microbiana, ao qual são compostos por estruturas complexas designadas como microcolônias, estas heterogêneas, que possuem a permeabilidade de influir alguns nutrientes e fluidos.

É relatado que os biofilmes podem ser descritos como material característico da evolução de microrganismos. Onde estas matrizes são principalmente constituídas por moléculas de DNA, proteínas, polissacarídeos, íons e marginalmente por água (RITMANN, 2017; PERCIVAL et al., 2011; JAMAL et al., 2017).

Sobre os caminhos que levam a formação do biofilme, Kasnowski et al. (2010), descreve que existem ao menos três mecanismos ao qual podem ser constituídos esse material. Em um primeiro processo, a formação se dá pelo impacto da motilidade em superfície bacteriana que promove a redistribuição de células anexadas. Na segunda possível síntese, bactérias podem sofrer processo de divisão binária e no terceiro mecanismo uma grande massa de células são recrutadas para a formação de uma estrutura biofilme. A forma, ou escolha de qual mecanismo será requerido para a formação dos biofilmes nas estruturas bacterianas, irá depender de aspectos relacionados com a natureza da superfície onde este organismo se encontra, e de aspectos físicos-químicos condicionantes do ambiente.

De maneira mais específica, no que se refere aos estágios de formação do biofilme é possível trazer a elucidação de quatro etapas: Adesão reversível, adesão irreversível, formação de matriz polimérica e por fim amadurecimento e dispersão. No primeiro estágio descrito como a adesão reversível, Jamal et al. (2017) explica que inicia-se uma atividade de quimiotaxia promovida por flagelos e pilis que aproximam

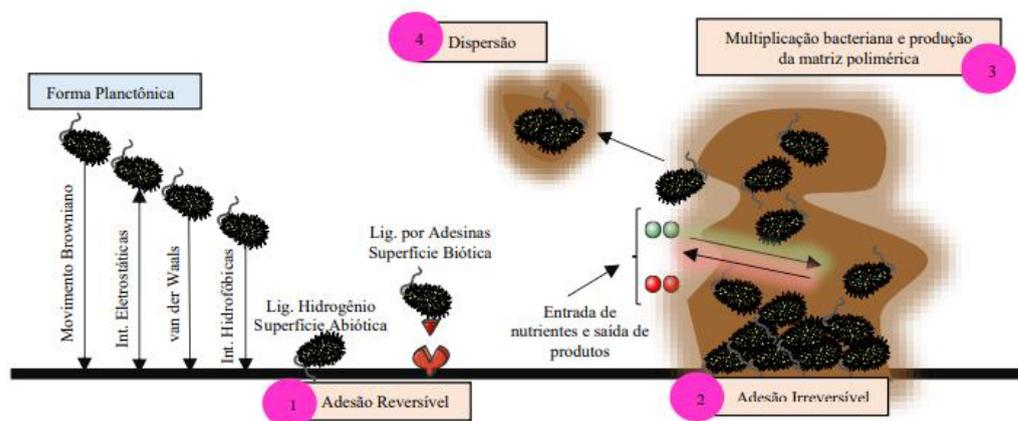
as bactérias que antea estavam dispersas na forma planctônica, á superfície por meio de movimentos brownianos, superando assim as forças de repulsão da superfície á bactéria. Aponta-se este estágio como reversível, devido a adesão das bactérias as superfícies serem possível de serem desfeitas por influência de forças eletrostáticas, atração de Van der Waals e interações hidrodinâmicas e hidrofóbicas.

Em um segundo estágio, a adesão muda de reversível para irreversível devido, adesinas específicas da superfície sintetizarem polímeros extracelulares, nas superfícies das bacterias, promovendo assim uma imobilidade do microrganismo, que consequentemente desencadeia o início a um processo de replicação bacteriana. É válido considerar, que neste segundo estágio, o meio, a fase de crescimento, as características específicas das linhagens microbianas e as suas sinalizações celulares podem influenciar no processo de aderência das células (JAMAL et al., 2017; RENDUELES et al., 2012; AKANKSHA et al., 2018).

Seguindo para o estágio da formação da matriz polimérica, percebe-se neste momento a existência de um biofilme maduro, isto devido à polimeros extracelulares conhecidos principalmente como exopolissacarídeos (EPS) atuarem como adesivos e como caminho para a passagem de nutrientes até as bactérias. Além disto, é descrito a existência de aglomerados bacterianos envolvidos por água, que auxiliam na passagem de nutrientes e oxigênio para o interior das células e permitem também a excreção de metabólitos para a região extracelular (AMARAL, 2020).

Ao chegar ao seu último estágio de formação o biofilme é preparado para dispersar suas bactérias, ocasionando assim uma a segregação a partir de enzimas sacarolíticas de comunidades bacterianas pela superfície. Bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, e *Pseudomonas fluorescens* para o desprendimento de seus agentes utilizam da produção de alginato-liase. (RENDUELES et al., 2012; AKANSKA et al., 2018).

Para elucidação dos estágios de formação de biofilme, Amaral (2020) retrata por meio da figura 3 a ilustração deste processo:

Figura 3. Os quatro estágios de formação de biofilme

Fonte: AMARAL, 2020.

Uma das principais preocupações do contexto clínico quanto as produções de biofilme advinda de agentes patogênicos, se dá ao fato desta estrutura conferir grau significativo de resistência bacteriana, prejudicando assim as terapias antibacterianas convencionais (CARVALHO, 2017).

Lewis et al. (2010), pontua que no interior dos biofilmes as bactérias acabam vivenciando processos evolutivos mais avançados e complexos que os seus ancestrais no que se refere aos seus aspectos fisiológicos, onde mesmo que possuam características genéticas semelhantes aos de seus grupos, a partir da existência de seus biofilmes elas se tornam, metabolicamente inertes, com processos de replicação lento, começam a regular a reparação do DNA e dos processos oxidativos, ampliam a modulação do sistema toxina-antitoxina e se tornam metabolicamente aceleradas na produção de fosfato, desencadeando comportamento resistente frente a concentração mínima inibitória de produtos antibacterianos.

Ashutosh et al. (2017), acrescenta que as colônias bacterianas em biofilme são capazes de se locomoverem para outras ambientes, o que fortalece ainda mais a propagação infecciosa. Diante disto, infecções como endocardites, prostatites, conjutivites, otites, vaginites, periodontites, implantes biomédicos direcionados ao tratamento de fibrose cística, lentes de contato, alguns cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos e até mesmo próteses, corriqueiramente são impactados pela formação de biofilmes bacterianos (JAMAL et al., 2017).

2.6.6 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa são bactérias Gram-negativas, de caráter oportunista ao qual apresentam ampla versatildade. Além disto, são agentes causadores de infecções

adquiridas em ambientes de internação hospitalar, em sua maioria correlacionadas com processos infecciosos que acometem pacientes em tratamento de câncer, imunodeprimidos pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV e em casos de queimaduras graves (SHOKRI et al., 2018; GOMILA et al., 2018).

Uma das principais preocupações que envolvem as *P. aeruginosas* refere-se ao fato de ser uma bactéria com alta adaptabilidade, o que confere a este microrganismo a capacidade de resistir aos antibióticos, tornando o efeito inibitório dos fármacos limitante (PANG et al., 2019).

Crespo et al. (2018), relata as *P. aeruginosa* como produtoras exímias de biofilme, o que as tornam interessante nos estudos onde há o intuito de investigar a atividade antibiofilme. Sabe-se que o biofilme é uma ferramenta que propõe as estas bactérias a capacidade de resiliência frente as respostas imunes em até 1000 vezes mais do que em situações onde não há a formação desta estrutura de resistência bacteriana.

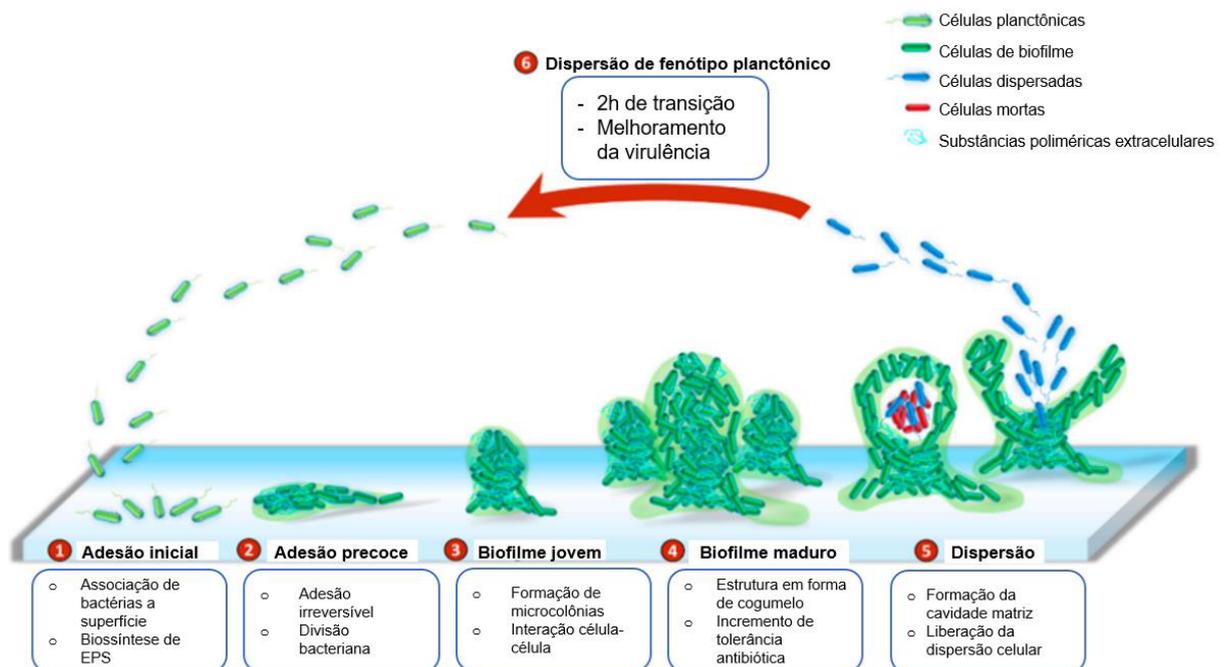
O crescimento dos biofilmes de *P. aeruginosa*, se dão maneira lenta, e em ambiente como pouca presença de oxigênio, quando em processos infecciosos acredita-se que esta síntese ocorre nas vias aéreas e em feridas crônicas, e em superfícies abióticas, corriqueiramente equipamentos médicos e implantes também são ambientes de formação desta estrutura (SONDERHOLM et al., 2017; O'TOOLE et al., 1998; KLAUSEN et al., 2003).

Sobre a elucidação específica da formação de biofilme por bactérias *P. aeruginosas*, Thi et al. (2020), descreve em seu estudo o ciclo da construção deste mecanismo de resistência em 6 fases, boa parte deste processo contempla aspectos gerais da formação de biofilmes bacterianos. Em um processo inicial, as bactérias seguem rumo a uma associação à sua superfície, para que assim realize a síntese das substâncias proteicas, DNA, lipídios, polissacarídeos e (EPS), em seguida numa segunda fase ocorre a transição de ligações, antes reversíveis agora irreversíveis, em uma terceira etapa efetua-se a formação de microcolônias com uma estrutura mais rigidamente aderida a superfície. Chegando à quarta etapa, autólises celulares promovem a liberação e o rompimento das microcolônias possibilitando assim a dispersão das células, e ainda neste período há uma transformação do material bacteriano que antes era sésil para plânctonico se disseminando em regiões ainda não colonizadas, além disto o que possibilita a efetuação deste processo é a degradação do DNA extracelular (eDNA) por endonucleases (EndA). Esta transição é dita como um detalhe crucial para que seja permitido a repetição do ciclo de

biofilme, onde se confere já a quinta e etapa da síntese (HICKMAN et al., 2008; MA et al., 2009; RASAMIRAVAKA et al., 2015; CHERNY et al., 2019).

O sexto e último estágio ocorre após 2h, descrita como fase de atraso a transformação fenotípica dos materiais bacterianos em plânctônicos com níveis reduzidos de c-di-GMP intracelular que é uma molécula sinalizadora para formação de biofilme e virulência à bactérias, e também de pioverdina conhecido como sideróforos que conferem fator de virulência à *P. aeruginosa* (OLIVEIRA, 2015; DE OLIVEIRA., 2018; CHUA et al., 2015). A figura 4 ilustra abaixo, ilustra o ciclo de formação de biofilme de bactérias *p. aeruginosa*.

Figura 4. Ciclo de síntese de biofilmes de *P. aeruginosa*



Fonte: THI et al., 2020; Adaptado pela autora.

3.1. Objetivo geral

Analisar a atividade citotóxica e antibiofilme de metabólitos secundários de isolados de *Trichoderma sp.*

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a CL_{50} para cada metabólito secundário de *Trichoderma* a partir de teste em *Artemia salina*.
 - Investigar a atividade citotóxica dos metabólitos secundários em células CALU-3 através do ensaio em MTT ;
 - Avaliar a atividade antibiofilme de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* dos metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma*.
-

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção dos isolados

Foram utilizados neste trabalho 10 isolados de *Trichoderma* denominados, 18, T00, 57, 46, B102, AB302, AM201, AB107, S404 e ALL42 provenientes da coleção de cultura do Laboratório de Enzimologia UFG. Os fungos foram mantidos com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocados a 4°C.

4.2 Condições de fermentação dos isolados de *Trichoderma* para produção dos metabólitos secundários.

Soluções esporos na concentração de 1×10^7 mL⁻¹ de cada um dos fungos foram inoculados em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio MYGP (malte 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona 0,3% e glicose 1%). Os frascos contendo cada um dos fungos foram incubados em agitador rotatório à 28°C a 200 rpm no escuro por 21 dias. Após esse período, os meios foram filtrados a vácuo e o filtrado (extrato bruto) foi submetido extração por partição líquido-líquido

4.3 Extração dos metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma*

Os filtrados (extratos brutos) dos isolados de *Trichoderma* foram submetidos à extração por partição líquido-líquido com acetato de etila. Após a separação das fases em um funil de separação, a fase apolar foi coletada e levada a um rotaevaporador. O resíduo formado foi ressuspensionado com solução de acetonitrila 50% em água. A exemplificação da extração dos compostos metabólitos secundários do fungo *Trichoderma* sp. estão expostos na figura 5 abaixo e as biomassas obtidas após o processo de rotaevaporação estão descritas na tabela 1.

Figura 5. Extração dos metabólitos secundários



Fonte: Aatoria própria.

Tabela 1. Biomassas obtidas dos metabólitos secundários

Isolados metabólitos	Biomassa
18	0,15g
57	0,15g
B102	0,42g
AM201	0,14g
T00	0,09g
ALL42	0,14g
46	0,21g
AB107	0,08g
AB302	0,15g
S404	0,9g

Fonte: Aatoria Própria

4.4 Avaliação da toxicidade dos metabólitos secundários de *Trichoderma* pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*

Os ensaios foram confeccionados a partir da metodologia adaptada de Rahman et al. (2005) com algumas alterações. Foram pesados 60mg de cistos de *Artemia salina*, que foram colocados para eclodir em água marinha sintética, preparada a partir da dissolução de 40g de sal marinho NaCl obtido comercialmente, em 1 litro de água destilada, acrescida de 6mg/L de extrato de levedura.

Após o preparo da água marinha sintética que foi realizado com o auxílio de um bécker de 1L e uma espátula para a dissolução dos sais, a solução salina foi submetida ao processo de autoclave dentro de uma garrafa com tampa meio rosqueada, sendo em seguida foi reservada para o esfriamento da solução, com o intuito de que logo após um período de aproximadamente 5 horas fosse transferida para o artemilheiro. Este confeccionado a partir do uso de um funil de decantação, suspenso através de um suporte de ferro.

Na etapa de organização do artemilheiro, foram transferidos 500 mL da solução salina ao funil, seguido da adição de 60mg dos cistos da Artemia. Além disto, para que a solução estivesse em aeração constante, foi adicionado na região interna do funil, uma mangueira de uma bomba para oxigenação de aquário, com o intuito de manter a oxigenação constante dentro do artemilheiro em ambiente fechado.

Após a incubação dos cistos em água marinha artificial no artemilheiro, durante um período de 36 horas, em temperatura ambiente de aproximadamente

25°C, com iluminação constante, realizou-se a pesca dos náuplios, recém eclodidos. Para a este processo, utilizou-se uma pequena lanterna para atrair os náuplios para a região inferior do funil, e com o auxílio de uma placa de petri de vidro, foram despejados parte da água marinha artificial com as Artemias dentro da placa.

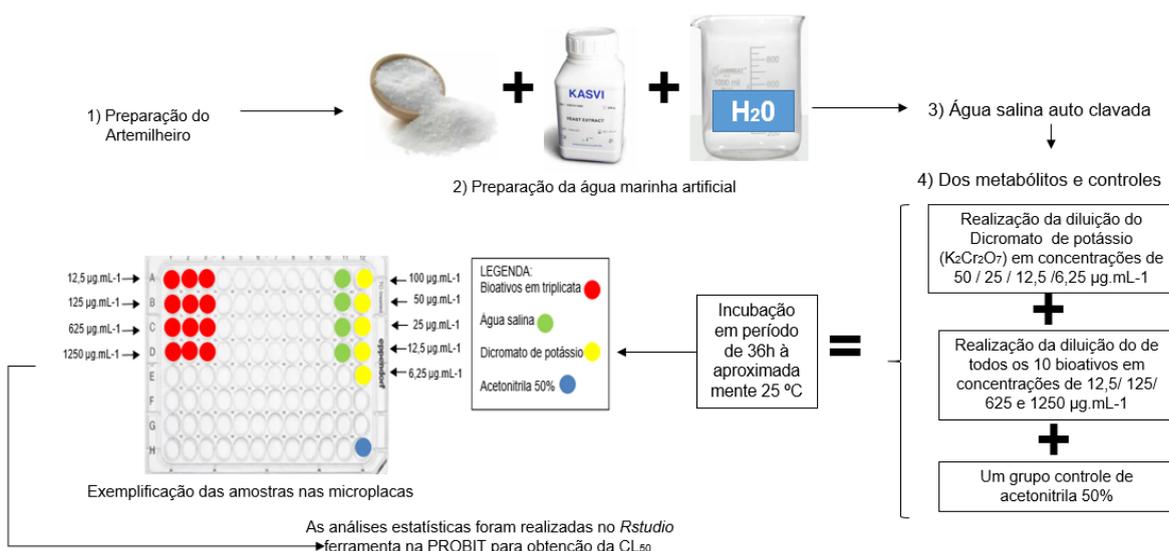
Foram pescados 10 indivíduos em 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de água marinha artificial, por meio do auxílio de uma pipeta de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma lupa do contador de colônias de bactérias digital, este útil para ampliar a visualização dos náuplios dentro da placa de petri. Os 100 μL com os 10 indivíduos foram transferidos para poços de uma microplaca poliestireno de de 96 poços.

Para cada um dos 10 metabólitos secundários de isolados de Trichoderma, foram utilizadas as concentrações de 1250, 625, 125 e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, preparadas com os extratos de metabólitos secundários dissolvidos em água marinha artificial oriunda dos 500mL restantes de água marinha artificial que não foram empregados ao artemilheiro. Estas concentrações foram dispostas em 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em triplicatas nas microplacas de cultura de células, nos poços que já haviam sido transferidos 10 náuplios em um volume de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após este processo de exposição dos náuplios ao bioativos, as placas foram dispostas em bancada por mais um período de 24 horas, ainda sob iluminação constante e temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, para que no dia seguinte fosse realizada a leitura.

Na realização de leitura, para o auxílio da visualização dos poços, fez-se a utilização do contador de colônias de bactérias digital, e foram realizadas as leituras a partir da contabilização de indivíduos mortos em cada um dos poços, em suas diferentes concentrações.

Foram incluídos também, no ensaio com a Artemia alguns poços que não apresentavam os bioativos, somente os indivíduos e a adição de concentrações de 100, 50, 25, 12,5 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_2$) este adicionado como controle de técnica e um controle com acetoneitrila 50%. A partir dos dados, análises estatísticas foram efetivadas para a determinação da (DL_{50}) dos bioativos utilizados no experimento. Além disto, o teste foi realizado em 3 réplicas para cada concentração, totalizando para cada concentração, testes com um total de 90 indivíduos. Para a elucidação da preparação e execução dos testes com Artemia salina segue a figura a 6.

Figura 6. Ensaio em *Artemia salina*



Fonte: Autoria própria.

Com o objetivo de confirmar que não houve contaminação da solução salina desde o início do ensaio, foram dispostos em todos os testes quatro poços com 10 indivíduos em um volume de 100 μl acrescidos de 100 μl da água salina que havia sido utilizada na dissolução dos bioativos. Além de um poço com 100 μl de acetoneitrila 50%, que foi adicionado para a certificação de que a acetoneitrila não é um agente tóxico as Artemias.

A realização do ensaio de letalidade com *Artemia salina*, foi aplicado por meio do uso de 10 extratos de metabólitos secundários: 18, T00, 57, 46, B102, AB302, AM201, AB107, S404 e ALL42.

Para a elucidação dos resultados obtidos no ensaio de letalidade em *Artemia Salina*, foram coletados os dados de indivíduos mortos e vivos e dispostos em tabelas no Excel ® separadas para cada composto, e a partir da ferramenta *Probit*, por meio do aplicativo Rstudio foram obtidos os resultados referentes as (CL_{50}) dos extratos metabólitos, além disto o programa dispõe da demonstração das concentrações mínimas de mortes e das concentrações máximas, a fim de que possa ser estabelecido um intervalo entre os valores inferiores e superiores as (CL_{50}) descritas sobre cada composto.

4.5 Ensaio Biológico *in vitro*

4.5.1 Culturas das linhagens CALU-3

Foram utilizadas células CALU-3 do banco de células do laboratório de Biotecnologia molecular de fungos da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,

departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade de São Paulo (USP). A linhagem celular CALU-3, são células de adenocarcinoma pulmonar humano, derivada de um sítio metastático, que se caracterizam como células epiteliais e se desenvolvem de forma aderida. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 pH 7,4, contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, suplementado com 24 mmol.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato sódico e com 10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por litro. As culturas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%.

As células CALU-3 (1,5 x 10⁴ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h com meio completo para reestabelecimento das condições adequadas, por exemplo, a completa adesão celular. Para a avaliação da citotoxicidade, as linhagens CALU-3 foram incubadas em dois períodos, 24 e 48 horas com as concentrações de metabólitos secundários nas seguintes concentrações: 12, 8, 4, 1 e 0,5 µg.mL⁻¹.

4.5.2 Determinação da citotoxicidade dos metabólitos dos isolados de Trichoderma pela viabilidade celular por meio do ensaio de redução de MTT.

As células nas condições de cultivo descritas acima foram tratadas com os metabólitos secundário dos isolados de Trichoderma nas concentrações descritas no item 4.5.1 e avaliada a viabilidade em dois momentos, 24 e 48 horas, onde o metabolismo celular avaliado pela redução do reagente MTT 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MOSMANN et al., 1983). Após o período de tratamento, o meio de cultivo foi retirado e desprezado, 200µL de uma solução de azul de tetrazólio (MTT) a 0,5 mg/mL foi adicionada nos poços que continham as células, seguindo a metodologia descrita por Mosmann (1983). Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 2 horas, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazan. Após este período foi retirado o sobrenadante (solução de MTT) e na sequência os cristais formados foram solubilizados em 200 µL de dimetilssulfóxido (DMSO). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 550 nm, em leitora de placas (*Biotek, µQuant*). Para o cálculo da viabilidade celular (%) utilizou-se a equação abaixo. Atividade mitocondrial representa o aumento ou diminuição em relação às células não estimuladas, expresso em porcentagem.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Absorbância média das amostras}}{\text{Absorbância média do controle}} \times 100$$

4.6 Análises Estatísticas

Para que a análise seja realizada, é necessário a obtenção do aplicativo Rstudio 3.4.0 (R CORE TEAM, 2017) de acordo com CARVALHO et al. (2017), as quais foram seguidas as suas recomendações sobre o download e instalação do programa, após a instalação é solicitado a programação específica orientada pelos autores, para que assim seja realizada a análise dos dados antes tabelados pelo pesquisador agora no programa R por meio da ferramenta *Probit* que possui 95% de intervalo de confiança.

A partir da observação de Meyer e colaboradores (1982), há estabelecida uma classificação a respeito da toxicidade das amostras aplicadas ao ensaio de letalidade com *Artemia*, a qual doses que apresentam uma $(CL_{50}) > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, não são consideradas tóxicas e de maneira contrária, amostras com $(CL_{50}) < 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ são designadas como tóxicas.

Após os ensaios de letalidade em *Artemia salina*, os metabólitos dos isolados de *Trichoderma* que apresentaram CL_{50} com concentração de até $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (18, T00 e 46) foram selecionados para os ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular pelo método de MTT e inibição de biofilmes de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

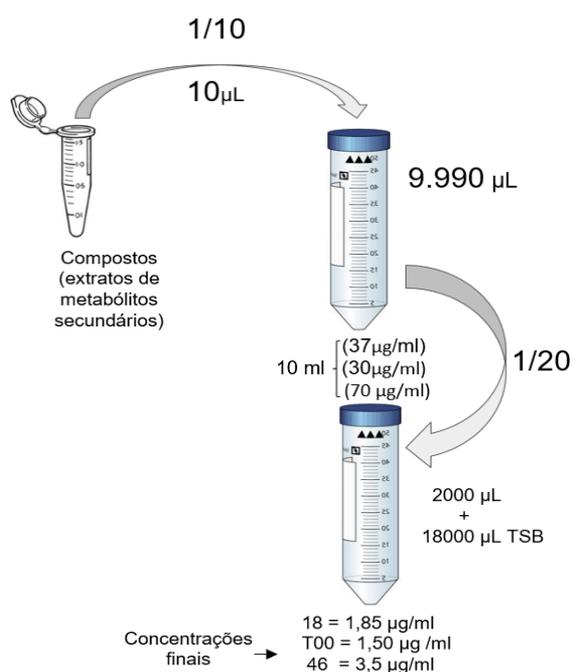
4.7 Ensaio de inibição dos metabólitos secundários de isolados de *Trichoderma* em biofilmes de cepas de *Pseudomonas Aeruginosa*

4.7.1 Preparação dos compostos

Os metabólitos secundários de isolados de *Trichoderma* selecionados a partir dos ensaios de toxicidade em *Artemia salina*, isolados 18, T00 e 46, seguiram para os ensaios de inibição de biofilmes em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Assim, foram utilizadas as concentrações que variaram de acordo com as concentrações dos metabólitos dos isolados de *Trichoderma* (Figura 9).

Dessa forma, foram diluídos em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*), cada metabólito foi submetido separadamente ao processo de diluição de acordo com a figura 9 abaixo:

Figura 7. Diluição dos metabólitos secundários em caldo TSB



Fonte: Autoria própria.

As concentrações finais utilizadas para o ensaio foram, metabólito T00 = 1,5 µg/ml⁻¹, 18 = 1,85 µg/ml⁻¹ e 46 = 3,5 µg/ml⁻¹.

4.7.2 Ensaio de formação de biofilme

Para a realização dos ensaios de formação de biofilme as quantificações da biomassa total dos biofilmes foram realizadas pelo método do cristal violeta conforme descrito por Stepanović et al. (2000) acrescido de algumas modificações.

Um total de 13 *Pseudomonas aeruginosa* foi avaliado, sendo 11 isolados clínicos gentilmente cedidos pela profa. Lilian Carneiro do Laboratório de Biotecnologia de Micro-organismos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás e 2 cepas padrão do tipo *American Type Culture Collection* - *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 da coleção do Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Goiás - UEG.

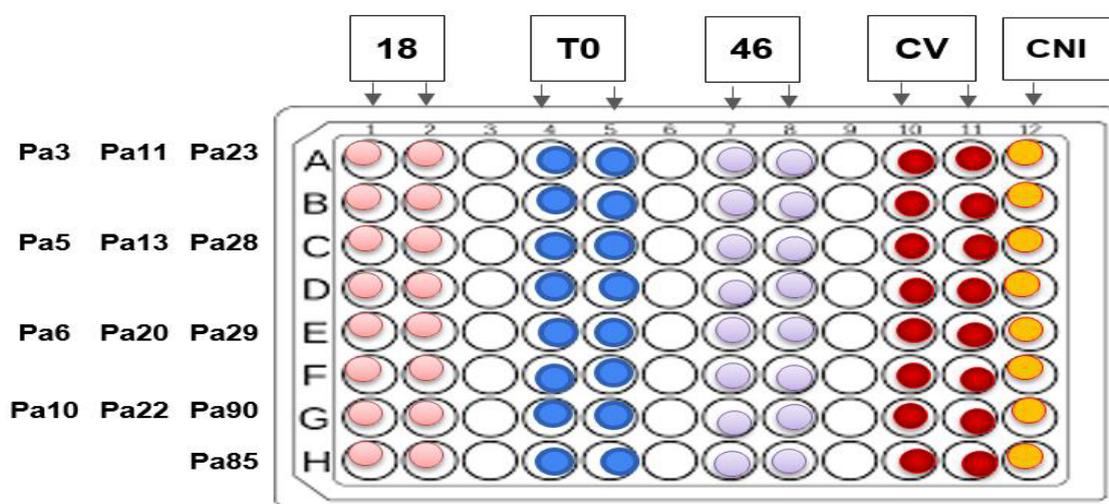
As alíquotas dos micro-organismos foram reativadas em ágar cetrimide (Kasvi, Espanha) suplementado com 10% de glicerina PA (Synth, São Paulo, Brasil) a 35,5° C por 24 horas e o aspecto macroscópico das colônias e pureza das amostras foram checados antes do início dos testes. Após a incubação, três a cinco colônias típicas foram dissolvidas em solução fisiológica estéril (SFE 0,9%) e a turbidez da

suspensão foi ajustada com a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, 0,1 mL da suspensão foram transferidos para tubos com 9,9 mL de caldo triptona soja (TSB). A partir desta solução microbiana, 50 μL foram colocados em poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo plano contendo 50 μL dos compostos descritos como metabólitos secundários por poço, perfazendo um inóculo bacteriano inicial de $1,5 \times 10^5$ ufc por poço e a concentração de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, e a microplaca foi incubada a $35,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Em seguida, foram realizadas leituras visuais das microplacas onde o processamento foi realizado segundo metodologia descrita por Naves et al. (2008) com modificações. O caldo Triptona soja (TSB) foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com 150 μL com SFE em lavadora automática de microplacas Aquari® (MA 615, Brasil) para a remoção das células não aderidas. Após isto, foram adicionados 150 μL do corante cristal violeta 1% nas placas por 10 minutos. Posteriormente, o corante foi desprezado e os poços lavados três vezes com 200 μL de água destilada, com o descarte do volume total e secagem das placas a $35,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos em estufa. Em seguida foram adicionados 150 μL de etanol absoluto (*Neon*) em cada poço para a coloração das bactérias aderidas, a microplaca foi incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente e foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DO) dos poços a 492 nm no espectrofotômetro de microplacas *BioTech Epoch™*.

Foram utilizadas ao todo 9 microplacas para a realização dos ensaios com os metabólitos secundários, devido teste ser realizado em triplicadas, ou seja, três microplacas para cada grupo de bactéria testado. Para melhor elucidação experimento está esquematizado nas figuras abaixo:

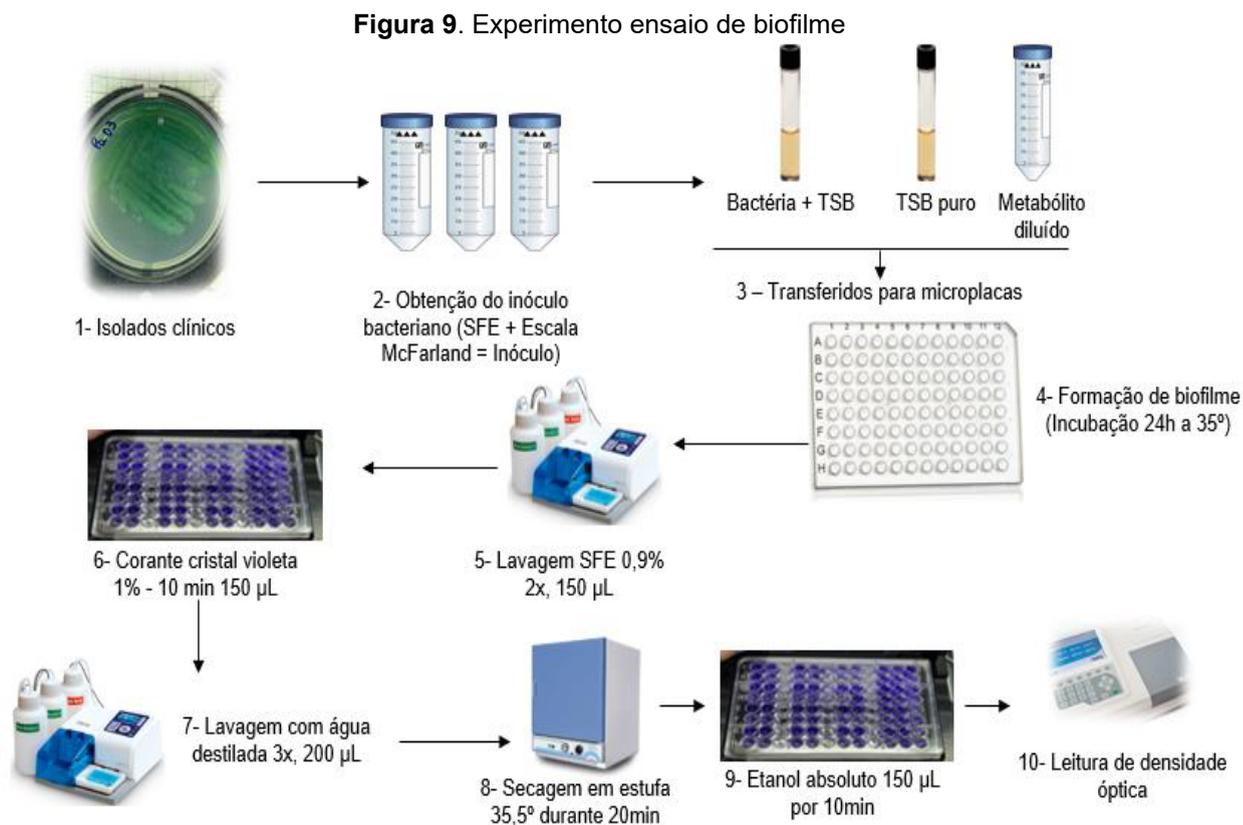
Figura 8. Disposição dos compostos nas microplacas



Legenda: Pa (*Pseudomonas aeruginosa*) Pa 85 e 90 cepas padrão ATCC; 18/T0/46 = Metabólitos

secundários; CV = Controle de Viabilidade (Bactéria sem composto); CNI = Controle Não Inoculado (Apenas TSB).

Fonte: Autoria Própria.



Fonte: Autoria própria.

Para a classificação das leituras de DO das bactérias quanto à formação de biofilme foram descritas quatro categorias: não formadora (NF), formadora débil (FD), formadora moderada (FM) e formadora forte (FF) de acordo com as seguintes fórmulas (STEPANOVIĆ et al. 2000):

$$NF = DOBA \leq DOPC = 0,061$$

$$FD = DOBA > DOPC \leq 2x DOPC = 0,061 \text{ até } 0,122$$

$$FM = DOBA > 2x DOPC \leq 4x DOPC = \text{maior que } 0,122 \text{ até } 0,244$$

$$FF = DOBA > 4x DOPC = \text{maior que } 0,224.$$

Onde a DOPC = densidade óptica do poço controle e DOBA = densidade óptica da bactéria aderida.

Portanto para a análise dos resultados sobre a formação de biofilme frente a presença de metabólitos secundários, realizou-se a comparação dos grupos tratados e não tratados e através da verificação das significâncias de diferenças, estabeleceu-se os valores determinavam a inibição ou não inibição da formação do biofilme de *pseudomonas aeruginosas*. A significância das diferenças foi avaliada com o teste t de Student ($p \leq 0,05$). Todos os testes foram realizados em triplicatas independentes.

Foram incluídos controles de viabilidade e de esterilidade para cada condição testada.



5.1 Avaliação da toxicidade dos extratos de metabólitos secundários pelo ensaio de letalidade em *Artemia salina*

Com a avaliação da concentração letal média (CL_{50}) dos metabólitos produzidos pelos isolados utilizados neste estudo em *Artemia salina* permitiu a seleção dos metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* com toxicidade importante dentro da classificação de Meyer, 1982. A tabela 2, mostra os valores obtidos através das análises estatísticas obtidas através do software *Rstudio* por meio da ferramenta *PROBIT*, que demonstrou as (CL_{50}) e o intervalo de confiança de cada um dos metabólitos secundários testados.

Tabela 2. Avaliação de toxicidade em *Artemia salina* de metabólitos secundários de fungos de espécies de *Trichoderma spp.*

Isolados metabólicos	CL_{50} $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Intervalo de confiança 95%		Classificação de toxicidade (MEYER, 1982)
		Limite inferior $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Limite superior $\mu\text{g.ml}^{-1}$	
18	67,53	35,46	114	Apresentou toxicidade
T00	12,12	3,32	22,26	Apresentou toxicidade
46	50,42	23,34	91,16	Apresentou toxicidade
B102	0,00391	4,78	1987	Apresentou toxicidade
AM201	626	220	6218	Apresentou toxicidade
AB107	3692	1485	30063	Não apresentou toxicidade

Fonte: A autora.

Os controles utilizados para a viabilidade do ensaio, a acetonitrila 50% e apenas a água marinha artificial, não apresentaram mortes, indicando que não houve contaminação da solução salina e que a acetonitrila 50% não exerceu influência tóxica aos indivíduos do estudo, enquanto que o controle de técnica, Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), apresentou (CL_{50}) de 24,28 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Mediante os resultados obtidos observou-se que os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* 18, T00, 46, AM201 apresentaram toxicidade relevante, com CL_{50} inferiores a 1000 $\mu\text{g. ml}^{-1}$. Não foi possível o estabelecimento de uma concentração letal média (CL_{50}) dos isolados de *Trichoderma* 57, AB302, S404 e

ALL42, pelo fato de que, os valores das mortes não apresentaram variações estatísticas, impossibilitando assim, a elucidação de um resultado por meio do *Rstudio*. Portanto ao analisar os dados brutos do ensaio em *Artemia salina* destes metabólitos, observou-se que a partir da concentração de $125 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ todos os indivíduos do ensaio morreram. Apenas para o metabólito ALL42, não houve toxicidade relevante em nenhuma das concentrações testadas, demonstrando um percentual de 83,33% de sobrevivência dos indivíduos testados.

Já os metabólitos secundários do isolado de *Trichoderma* AB107 apresentaram CL_{50} , com valor de 3692, ultrapassando o limite de acordo com Meyer et al. (1928), portanto, não apresentando toxicidade. É importante salientar que os metabólitos do isolado de *Trichoderma* B102 embora tenha apresentado valores de CL_{50} estes mostram uma elevada toxicidade (Tabela 2).

Além disto, resultados semelhantes ao deste estudo, foram elucidadas por outros autores que investigaram a atividade toxicologia de extratos de *Trichoderma asperellum* dl34, *T. citrinoviride* cf27 e *T. harzianum* R5 em *Artemia salina*. Neste experimento os autores isolaram e identificaram 18 compostos de *T. asperellum* ao qual destes metabólitos descritos como diterpenóide (TA1) e (TA2) que apresentaram $\text{CL}_{50} = 12,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e $38,2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, a partir do fungo *T. citrinoviride* cf27 cerca de 23 composto também foram destacados, destes um norditerpenóide (TC2) demonstrou $\text{CL}_{50} = 65,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, por fim dos 14 compostos investigados de *T. harzianum* R5, o terpenóide (TH1) resultou em uma $\text{CL}_{50} = 68,6 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (LIANG, 2016).

Nisto, verifica-se uma maior amplitude toxicologia quando refere-se aos extratos de metabólitos de fungos *Trichoderma*, isto quando comparados por exemplo com outros extratos obtidos por meio de micélios de fungos como o *Diplodia pinea*, fungo com a característica capaz de se comportar tanto como endofítico ou saprofítico. Aponta-se esta consideração, devido após a realização de ensaios de letalidade extratos de *Diplodia pinea*, somente um dos seus 7 compostos, foi possível obter-se a CL_{50} de $746,1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (MOURA, 2021).

Quando comparados com outros metabólitos da mesma espécie, a partir do ensaio realizado por Melo (2021), foi observado que de um total de 12 extratos de *Trichoderma spp*, após serem administrados os compostos aos náuplios em um período de 24 horas, 8 dos metabólitos, estes nomeados como 235 BE, 235 BM, 235 FM, 767 BE, 767 BM, 767 FE; 1172 BM e 1172 BM não apresentaram toxicidade os indivíduos do estudo.

Nortate et al. (2018), também realizou ensaios de letalidade em *Artemia salina* com extratos de diversos fungos como *Aspergillus*, *Thamnidium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sclerotinia* e *Trichoderma*, onde em uma média geral de toxicidade os extratos apresentaram uma variação de de CL_{50} de 201,56 – 948,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A respeito dos extratos metabólicos de *Trichoderma* que não apresentam toxicidade a *Artemia salina*, Song et al. (2019), ao analisar alguns derivados de *Trichoderma asperellum A-YMD-9-2*, destacou que o metabólito catenioblin C, na $CL_{50} = 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não apresentou nenhum grau de letalidade em seu estudo.

5.2 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de metabólitos secundários

Não foi possível avaliar o efeito citotóxico em linhagens CALU-3, que são células de adenocarcinoma pulmonar humano, derivada de um sítio metastático. A viabilidade celular foi discrepante entre as concentrações testadas dos metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma*. Observa-se que para os metabólitos do isolados 18 e 46 (Tabelas 3) as concentrações utilizadas diminuiu em média 20% da viabilidade celular com exceção da concentração 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ que não alterou a viabilidade celular. Os metabólitos secundários do isolado de *Trichoderma* T00, apresentou em média uma diminuição em torno de 13% entre as concentrações utilizadas (Tabela 3). Mediante os resultados fica evidente que as concentrações devem ser reavaliadas e outras células podem também ser utilizadas.

Lu et al. (2018), após a extração e identificação de um polissacarídeo (TPS), oriundo de *Trichoderma kangansensis*, observou que em ensaio de citotoxicidade por MTT em células normais não apresentam nenhum grau de letalidade, já em tumorais CT26, o polissacarídeo foi eficiente em inibir a uma concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$, cerca de 34,28% do material cancerígeno.

Estudos sobre citotoxicidade com extratos de *Trichoderma Reesei*, também foram realizados por Sajadi et al. (2022), ao qual antes de realizar os ensaios em MTT, identificou seus compostos por cromatografia e espectrometria de massas (GC-MS), obtendo assim das seguintes substâncias: hidroxietil benzaldeído, cineal, ciclohexeno, acetato de terpenil, ácido propiônico, ácido octadecanóico e ácido hexadecanóico, concomitantemente no que se diz respeito á ação do extrato contra células de linhagem cancerígena Hepa1-6, observou-se eficácia de 10-15% de toxicidade.

Além disto, Li et al. (2017), acrescenta sobre a TPA1 substância decorrente

de metabolismo de *Trichoderma sp. KK19L1*, que este composto apresenta potencial atividade contra células cancerígenas, após a promover estudos que demonstram indução a apoptose de células HeLa em fase G2/M.

Tabela 3. Viabilidade celular referente a exposição dos metabólitos secundários do isolado 18, T00 e 46 em 48 horas.

Isolado	Metabólitos	Viabilidade %
	Calu-3 (1,5 x 10⁴ células/poço)-Controle	100
	Controle 0,5 µg.mL⁻¹	111,2903
18	1,0 µg.mL ⁻¹	88,01843
	2,0 µg.mL ⁻¹	81,33641
	4,0 µg.mL ⁻¹	107,6037
	8,0 µg.mL ⁻¹	82,94931
	12,0 µg.mL ⁻¹	81,56682
		Controle 0,5 µg.mL⁻¹
T00	1,0 µg/mL	96,543778
	2,0 µg/mL	84,3318
	4,0 µg/mL	96,31336
	8,0 µg/mL	100
	12,0 µg/mL	81,56682
		Controle 0,5 µg.mL⁻¹
46	1,0 µg/mL	86,86636
	2,0 µg/mL	87,32719
	4,0 µg/mL	112,212
	8,0 µg/mL	87,5576
	12,0 µg/mL	85,25346

Fonte: Autoria própria.

5.3 Avaliação da atividade inibitória da formação de biofilme de *P. aeruginosa* por metabólito secundário de *Trichoderma sp.*

A atividade antibiofilme dos metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* 18, T00 e 46 produzidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi analisada (Tabela 5). Para um comparativo foi utilizado a tabela 4 onde mostra a categoria de formação de biofilme entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 4. Índice e categoria de formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

Cepas	DO492nm		Categoria de Formação Biofilme
	MED	DP	
Pa3	0,142	0,069	Moderada
Pa 5	0,356	0,109	Forte
Pa 6	0,394	0,082	Forte
Pa 10	0,256	0,067	Forte
Pa 11	0,142	0,018	Moderada
Pa 13	0,192	0,063	Moderada
Pa 20	1,077	0,442	Forte
Pa 22	0,166	0,068	Moderada
Pa 23	0,265	0,072	Forte
Pa 28	1,676	1,153	Forte
Pa 29	0,983	0,731	Forte
Pa 27853	0,246	0,103	Forte
Pa 9027	0,170	0,051	Moderada
CNI	0,061	0,011	-

Legenda: **Pa** = *Pseudomonas aeruginosa*; **ATCC** = *American type culture collection*; **DO_{492nm}** = Densidade óptica a 492 nanômetros; **MED** = Média **DP** = desvio padrão; **CNI** = Controle não inoculado.

Das 13 cepas bacterianas, nove foram classificadas como formadoras fortes de biofilme (69,2%), quatro foram classificadas como moderadas (30,7%) e nenhuma foi classificada como fraca.

Em seguida a tabela 5 abaixo, representa os resultados referentes a produção de biofilme sob o efeito dos extratos metabólitos secundários 18, T00 e 46, estes resultados foram organizados (tabulados) e calculados o seus DP (Desvio Padrão) e suas MED (Médias).

Tabela 5. Resultados da formação de biofilme na presença de metabólitos secundários

Cepas	18		T00		46		CV		p		
	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP	18 vs CV	T00 vs CV	46vs CV
Pa 3	0,137	0,020	0,099	0,013	0,136	0,067	0,142	0,069	0,467	0,107	0,296
Pa 5	0,255	0,071	0,250	0,061	0,166	0,055	0,356	0,109	0,759	0,695	0,274
Pa 6	0,186*	0,047	0,279	0,094	0,268	0,055	0,394	0,082	0,002	0,181	0,082
Pa 10	0,179	0,043	0,168*	0,064	0,181*	0,044	0,256	0,067	0,257	0,001	0,021
Pa 11	0,386	0,061	1,152	0,200	0,358	0,079	0,142	0,018	0,015	0,002	0,011
Pa 13	0,514	0,052	0,760	0,237	0,922	0,159	0,192	0,063	0,076	0,077	0,022
Pa 20	0,345*	0,032	0,249	0,081	1,641	0,512	1,077	0,442	0,095	0,017	0,016
Pa 22	0,170	0,041	0,131	0,034	0,100	0,023	0,166	0,068	0,335	0,806	0,083
Pa 23	0,191	0,061	0,148	0,075	0,133	0,043	0,265	0,072	0,283	0,111	0,028
Pa 28	1,897	0,453	2,968	0,181	2,627	0,331	1,676	1,153	0,018	0,002	0,008
Pa 29	0,585*	0,162	0,946*	0,296	1,166	0,466	0,983	0,731	0,034	0,021	0,030
Pa 85	0,233	0,054	0,232	0,071	0,199	0,088	0,246	0,103	0,521	0,222	0,678
Pa 90	0,119	0,023	0,090*	0,013	0,141*	0,065*	0,170	0,051	0,852	0,003	0,027
CNI	0,140	0,026	0,137	0,038	0,142	0,056	0,061	0,011	-	-	-

Legenda: Pa (*Pseudomonas Aeruginosas*); 18/T00/46 = Metabólitos secundários; CV = Controle de Viabilidade (Bactéria sem composto); CNI = Controle Não Inoculado (Apenas TSB); * = Diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria Própria.

Para a análise dos resultados da formação do biofilme na presença dos metabólitos secundários, realizou-se a comparação da média (MD) do grupo não tratado (CV) com os resultados médios do 18, T00 e 46. Neste aspecto a significância das diferenças (p) foram avaliadas com o teste t de Student ($p \leq 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos dos tratamentos das cepas de *P. aeruginosa*, com extratos de metabólitos secundários, o composto 18 na concentração de (1,85 µg/ml⁻¹) apresentou significativa inibição de formação de biofilme perante as cepas Pa6, Pa20 e Pa29, já o composto T00 na concentração de (1,50 µg/ml⁻¹) demonstrou significativa inibição da formação de biofilme as cepas Pa10, Pa29 e Pa90, e por fim 46 na concentração (3,5 µg/ml⁻¹) inibiu significativamente a formação de biofilme das cepas Pa10 e Pa90, ambas as cepas inibidas na presença de metabólitos secundários são consideradas fortes produtoras de biofilme, com exceção da cepa Pa 90 que é considerada formadora moderada de biofilme, de acordo com dados visualizados na tabela 4 .

Outros estudos desenvolvidos por Cordeiro et al. (2022), também apresentaram resultados positivos, no que se refere a inibição da atividade bacteriana de patógenos Gram negativos e Gram positivos, ao qual na presença de extratos de *Trichoderma sp* FSF12 o composto apresentou uma (CMI = 31,25 µg/ml⁻¹) para *P. Aeruginosa*, (CMI = 15,62 µg/ml⁻¹) frente a *Escherichia coli* e (CMI= µg/ml⁻¹) para *Bacillus subtilis*. Ainda neste trabalho, a partir de técnicas cromatográficas foram verificados nos extratos do fungo empregados no ensaio antibacteriano a presença de cinco metabólitos secundários diferentes descritas como (1) 5'- inosil, (2) tirosol, (3) ácido graxo poliinsaturado, (4) harzialactona e (5) 2-anidromevalônico.

Melo (2021), em uma investigação sobre as atividades antimicrobianas de fungos *Trichoderma*, mais especificadamente com *T. crassum*, *Trichoderma sp.* e *T. Harziaum*, contra outros fungos e bactérias, empregou extratos de metabólitos secundários destes agentes para a obtenção de concentrações mínimas inibitórias destes compostos em bactérias descritas como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

A partir da análise da exposição dos patógenos aos extratos de fungos, foram elucidados que algumas cepas de *P. aeruginosa* mostraram-se sensíveis á uma CMI = 0,03 mg.ml⁻¹a presença de metabólitos secundários 235BE oriundo de *T. crassum*, já frente aos extratos 767FE e 767FM de *Trichoderma sp.* às CMI obtidas foram (0,03 mg.ml⁻¹para o primeiro metabólito e 0,50 mg.ml⁻¹para o segundo), por fim em *T. Harzianum* maiores CMI foram vistas, frente ao composto 1172 FE CMI = 1,00 mg.ml⁻¹e aos 1172BM e 1172FM uma CMI = 0,50 mg.ml⁻¹.

No que se refere a inibição de biofilmes produzidos por *P. aeruginosas*, alguns autores relatam que estudos com *T. viriade*, aos quais possuem composição química

desconhecida, se mostraram efetivos na atividade antibiofilme (CHAPPELL e NAIR, 2020).

Dawande et al. (2019), também se propuseram a investigar fungos endofíticos em prol de verificar as possibilidades da existência de atividade antibiofilme destes agentes contra *P. aeruginosa*, como resultado observou-se que em uma concentração máxima de $200 \mu\text{g/ml}^{-1}$ de extrato de *Trichoderma sp.* houve uma inibição de 33,06% da formação de biofilme das bactérias.

- Neste estudo foram investigadas as atividades tóxicas, citotóxicas e inibitórias de isolados de *Trichoderma*;

- A avaliação da concentração letal média (CL_{50}) destes metabólitos em *Artemia salina*, foi interessante para realizar uma triagem dos isolados de *Trichoderma* onde, os metabólitos dos isolados AB107 não apresentaram toxicidade. Em relação aos metabólitos secundários dos isolados 57, AB302, S404 e ALL 42 não foi possível estabelecer a CL_{50} pelo software *Rstudio*. Porém ao analisar os dados brutos o ALL 42 não apresentou toxicidade, e os demais a partir da concentração $125 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ foram tóxicos para todos os indivíduos testados;

- Os metabólitos do isolado B102 apresentou toxicidade muito acentuada. Assim, os metabólitos secundários dos isolados 18, T00,46, AM201 apresentaram toxicidade relevante, com CL_{50} inferiores a $1000 \mu\text{g. ml}^{-1}$. Porém, ainda assim, foram considerados os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* que apresentaram concentrações de CL_{50} até $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Dessa forma, os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* selecionados para os ensaios seguintes foram 18, T00 e 46;

- Em relação aos resultados da viabilidade celular, os metabólitos secundários dos isolados apresentaram uma diminuição entre 13 a 20%, porém, não houve regularidade na diminuição da viabilidade entre as concentrações utilizadas em todos os metabólitos dos isolados;

- Mediante o exposto, há a necessidade em refazer este experimento com outras concentrações ou até mesmo a avaliação da viabilidade celular em outros tipos celulares. Mesmo assim, foi possível averiguar a interferência desses metabólitos na viabilidade celular;

- A atividade antibiofilme dos metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* frente a biofilmes produzidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* revelou que os três isolados utilizados (18, T00 e 46) foram muito eficientes naquelas cepas de *P. aeruginosa* categorizadas de acordo com a formação de biofilme como forte;

- Metabólitos secundários de espécies de *Trichoderma* veem apresentando um grande potencial de aplicação no campo da medicina e isto fica relevante com os resultados apresentados neste trabalho em relação à atividade antibiofilme em cepas

de *Pseudomonas aeruginosa* e até mesmo na viabilidade celular em células cancerosas.

ABDUL-HAMID, E.; ROY, R.; MCKAY, R. T.; TENORI, L.; SACCENTI, E.; GOWDA, G. A. N.; RAFTERY, D.; ALAHMARI, F.; JAREMKO, L.; JAREMKO, M.; WISHART, D. S. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 1-39, 2019.

ABREU, J. A. S. et al. Fungos de Interesse: aplicações Biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 55-59, jan./mar. 2015.

ADNAN, M. et al. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with Trichoderma in focus. **Microbial pathogenesis**, v. 129, p. 7-18, 2019.

AFZAL, M.; KHAN, Q. M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. **Chemosphere**, v. 17, p. 232-242, 2014. Citado em 2019.

AGOSTINI-COSTA, T Da S.; VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R et al., Secondary metabolites. **Chromatography and Its Applications**. p. 131-164. 2019.

AKANKSHA, R.; ANAMIKA, T; SHIVANGI, S et al. A biofilm: a resource of anti-biofilm agentes and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. **Nucleic Acids Res**. v. 46, p 849-900, 2018.

ALVAREZ, S.; MARSH, E. L.; SCHROEDER, S. G.; SCHACHTMAN, D. P. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. **Plant Cell Environ**. v. 31, n.3, p. 325-340, 2018.

AMARAL, L. S; **Erradicação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies pela terapia fotodinâmica utilizando a microbiologia preditiva multivariada e novos fotosensibilizadores**. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação interunidades em Bioengenharia e Área de concentração em Bioengenharia – USP. São Paulo. 2019.

AMAROUAYACHE, M.; KARA, M.H. Aspects of life history of Artemia salina (Crustacea, Branchiopoda) from Algeria reared in different conditions of salinity. **Vie Milieu**. 2017

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chemother**. v.48, Suppl. S1, p.5-16. 2001.

ANS. **Farmacopeia Brasileira**. v. 1, p. 546. 2010.

ANVISA/ NCCLS (CLSI). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. Norma M2-A8, vol. 23. n. 1, 2003.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography Mass Spectrometry: An Introduction. **Analytical Techniques in the science**. 2003.

- Arulvasu C, Jennifer SM, Prabhu D, Chandhirasekar D. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp artemia. **Scientific World Journal**. 2014.
- ASLAM, B.; BASIT, M; NISAR, M. A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M. H. Proteomics: technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182-196, 2017.
- ASHUTOSH, K.; ANWAR, A.; MAMTA, R et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **Int J Med Microbiol**. v. 307, p. 481-498, 2017.
- AWAD, N.E; KASSEM H.A, HAMED MA, ET AL. Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. **Mycology**. 2018.
- BELINATO, J.R; BAZOLI, J. M; SUSSULINI, A; AUGUSTO, F; FILL, T.P. Metabolômica microbiana: Inovações e aplicações. **Quí. Nova**; Vol. 42. 5, p. 546-559. 2019.
- BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews. Microbiology*, London, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.
- BRAKHAGE, A; SCHROECKH, V. BRAKHAGE, A. A; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal. Genet. Biol.* 48, 15-22. **Fungal genetics and biology: FG & B.** 48. p.15-22 (2010).
- BREITLING, R.; CENICEROS, A; JANKEVICS, A et al. Metabolomics for Secondary Metabolite Research. **Metabolites**, v. 3, n.4, p. 1076-1083. 2019.
- BRISSOW, E.R.; SILVA, I.P.; SIQUEIRA, K.A.; SENABIO, J.A.; PIMENTA, L.P.; JANUÁRIO, A.H.; MAGALHÃES, L.G.; FURTADO, R.A.; TAVARES, D.C.; JUNIOR, P.A.S.; SANTOS, J.L.; SOARES, M.A. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum-92C*, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Parasitology Research**, Berlin, v.116, n.7, p.1823–1830, 2017.
- CAMARGO, W.N.; DURÁN, G.C.; RADA, O.C et al. Determination of biological and physicochemical parameters of *Artemia franciscana* strains in hypersaline environments for aquaculture in the Colombian Caribbean. **Saline Syst**. 2005.
- CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A.R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n.1, p. 75-91, 2018.
- CARVALHO, I. H. G. **Ação antimicrobiana do extrato de *Lycium barbarum* frente a microrganismos superinfetantes do ambiente bucal**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- CARVALHO, J.R.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U.R.; HOLTZ, A. M. **Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos**. Colatina: IFES. P. 102. 2017.
-

CARRERAS-VILLASEÑOR, N., SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J.A., AND HERRERA-ESTRELLA, A.H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**. 2012.

CHANG, F. R.; WANG, S-W.; LI, C-Y.; LU, Y-Y.; LIU, S-Y. V.; CHEN, C-Y.; WU, Y-C.; CHENG, Y-B. Natural Products from Diaportheaceae with Anti-Angiogenic Activity. **Israel Journal of Chemistry**, v. 59, p. 1-8. 2019.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 7 – 15. 2006.

CHAPPELL, T.C.E.; NAIR, N.U. Os lactobacilos modificados exibem atividades antibiofilme e supressoras de crescimento contra *Pseudomonas aeruginosa*. **Npj Biofilms and Microbiomes**. (2020).

CHAVERRI, P. et al. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, v. 95, n. 6, p. 1100-1140, 2003. Citado em 2015.

CHERNY, KE; SAUER, K. *Pseudomonas aeruginosa* requer a Endonuclease específica de DNA EndA para degradar o DNA genômico extracelular para se dispersar do biofilme. **J. Bacteriol.**, 201. 2019.

CHIN Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.C.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8, 2016.

CHUA, SL; HULTQVIST, LD; YUAN, M.; RYBTKE, M.; E NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; YANG, L. Geração e caracterização in vitro e in vivo de células dispersas em biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* via manipulação de c-di-GMP. **Nat. Protocolo**, 10, 1165-1180. 2015.

CRANEY, A., AHMED, S., NODWELL, J. Towards a new science of secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**. v.66: p.387–400, 2013.

CRESPO, A.; BLANCO-CABRA, N.; TORRENTS, E. Aerobic Vitamin B12 Biosynthesis Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II Ribonucleotide Reductase Activity During Planktonic and Biofilm Growth. **Front. Microbiol.** 9, 986. 2018.

COLLEMARE, J.; BILLARD, A.; BÖHNERT, H. U.; LEBRUN, MARC-HENRI. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, v. 112, p. 207-215, 2008.

CORDEIRO, J. DA S.; PINHEIRO, E.A.A.; SIQUEIRA, J.E. DE. S.; BITENCOURT, H.R.; MARINHO, P. S.B; MARINHO, A. M. DO R. Estudo químico e atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico do fungo de solo *Trichoderma sp* FSF12. **Research. Society and Development**, v. 11, n. 8. 2022.

DAWANDE, A. Y; GAJBHIYE, N. D; CHARDE, V. N; BANGINWAR, Y. S; Avaliação de isolados fúngicos endofíticos quanto à sua atividade antibiofilme em *Pseudomonas Aeruginosa*. **Rev. Internacional de Pesquisa Científica em Ciências Biológicas**. Vol. 6. Pp. 81-89. 2019.

DE OLIVEIRA PEREIRA, T. **Regulação da expressão de pioverdina dependente de contato em *Pseudomonas aeruginosa***, 121p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018.

DEBODE, J.; DE TENDER, C.; CREMELIE, P.; LEE, A. S.; KYNDT, T.; MUYLLE, H.; DE SWAEF, T.; VANDECASTEELE, B. Trichoderma-Inoculated Miscanthus straw can replace peat in strawberry cultivation, with beneficial effects on disease control. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 213, 2018.

DEMAIN, A. L.; Phamarceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied microbiology Biotechnology**. V. 52, p. 455-463. 1999.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advance in Biochemical Engeneering/ Biotechnology**, v. 69, p. 1-39. 2019.

DOS SANTOS DE OLIVEIRA, J. A.; GONÇALVES N. D. Fungos endofíticos diaporthe: uma fonte promissora de metabólitos para a área da saúde. **Arquivos do Mudi**, v. 26, n. 1, p. 39-50, 16 abr. 2022.

DRUZHININA, I. S.; CHENTHAMARA, K.; ZHANG, J.; ATANASOVA, L.; YANG, D.; MIAO, Y.; RAHIMI, M. J., GRUJIC, M.; CAI, F.; POURMEHDI, S.; SALIM, K. A.; PRETZER, C.; KOPCHINSKLY, A. G.; HENRISSAT, B.; KUO, A.; HUNDLEY, H.; WANG, M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; LIPZEN, A.; LaBUTTI, K.; BARRY, K.; GRIGORIEV, I. V.; SHENG, Q.; KUBICEK, C. P. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 4, e1007322, 2018.

FELBER, AC et al. Produção de endoglucanase por fungos endofíticos isolados de *Vitis labrusca* L. com casca de amendoim e serragem como substratos. **Bioscience Journal**, v.35, n.3, p.933-940, 2019.

FERNANDES, R. T. V.; GONÇALVES, A. A. Aspectos nutricionais da *Artemia* (*Artemia* sp.) – novos horizontes. **Aquaculture Brasil**, Laguna. Edição 2, setembro/outubro. p. 12 – 18. 2016.

FONSECA, S. D. G. Farmacotécnica de fitoterápicos. p. 62,. Disponível em: www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/Farmacot_Fitoterapicos.PDF. 2015.

FOTAKIS, G.;TIMBRELL J. A.. “Ensaio de citotoxicidade in vitro: comparação de LDH, vermelho neutro, MTT e ensaio de proteína em linhas celulares de hepatoma após exposição ao cloreto de cádmio.” **Cartas de toxicologia**. 2006.

FREITAS, V. R; VAN DER SAN, S.T; SIMONETTI, A.B. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Rev. Odontol. UNESP**. Araraquara. Jul/Ago. p.193-200. 2010.

GALO, L.; RAMÍREZ-RIGO, M. V.; PALMA, J. P. S.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V. Valeriana officinalis Dry Plant Extract for Direct Compression: Preparation and Characterization. **Scientia Pharmaceutica**. v. 80, p. 1013-1026, 2012.

GHAFOOR, A.; HAY, I.D; REHM, B.H. Papel dos exopolissacarídeos na formação e arquitetura do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. **Aplic. Ambiente. Microbiol.**, v.77, p. 5238-5246. 2011.

GOMILA, A.; CARRATALUMA, J.; BADIA, JM; CAMPRUBEU, D.; PIRIZ, M.; SHAW, E.; DÍAZ-BRITO, V.; ESPEJO, E.; NICOLUMAS, C.; BRUGUÉS, M.; et al. A profilaxia antibiótica oral pré-operatória reduz infecções do sítio cirúrgico por *Pseudomonas aeruginosa* após cirurgia colorretal eletiva: um estudo de coorte prospectivo multicêntrico. **BMC Infect. Des.** n.18, p.507. 2018.

GONG, ZHIQING et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1095– 1099, 2017.

GONZALEZ-MENENDEZ V., MARTIN J., SILES J.A., GONZALES-TEJERO M.R., REYES F., PLATAS G., TORMO J.R. & GENILLOUD O. Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. **Mycological Progress**, 16: p. 713–728. 2018.

GUPTA, S. K. et al. Bioelectrochemical technologies for removal of xenobiotics from wastewater. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 49, p. 1-24, 2022.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43, 2004.

HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; RUBIO, M. B.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: GUPTA, V. K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. (Ed.). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Amsterdam: **Elsevier**, p. 125-137. 2014.

HICKMAN, J.W; HARWOOD, C.S. Identificação de FleQ de *Pseudomonas aeruginosa* como um fator de transcrição responsivo a c-di-GMP. **Mol. Microbiol.** 2008.

HU, Z.; WU, Y.; XIE, S.; SUN, W.; GUO, Y.; LI, X. N.; LIU, J.; LI, H.; WANG, J.; LUO, Z.; XUE, Y.; ZHANG, Y. Phomopsterones A and B, two functionalized ergostane-type steroids from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. TJ507A. **Organic Letters**, v. 19, p. 258-261, 2017.

IGARASHI, M. A; Potencial de produção e exploração de *Artemia* nas salinas costeiras do Rio Grande do Norte. **Rev. Seminário de Visu**, Petrolina, v.9, n.2 p. 87-102, 2021.

IZQUIERDO-GARCÍA, J. L.; VILLA, P.; KYRIAZIS, A.; DEL PUERTONEVADO, L.; PÉREZ-RIAL, S.; RODRIGUEZ, I.; HERNANDEZ, N.; RUIZCABELLO, J. Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 59, p. 263-270, 2011.

JAMAL, M; AHMAD, W; ANDLEEB, S. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc.** p. 1-5, 2017.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal Secondary Metabolism -from Biochemistry to Genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-946, 2005.

KLAUSEN, M.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Envolvimento da migração bacteriana no desenvolvimento de estruturas multicelulares complexas em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.**, 50, p. 61-68. 2003.

KRUGER, C.D. Ocratoxina A em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária. I. Determinação de níveis séricos por cromatografia líquida. II. Correlação com as lesões renais e hepáticas. **Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**, Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ: 2015.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999–1007. 2010.

LI J, TENG Y, LIU S, WANG Z, CHEN Y, ZHANG Y, ET AL. Cinnamaldehyde affects the biological behavior of human colorectal cancer cells and induces apoptosis via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. **Oncology reports**. 2017.

LIANG, X. Estudo sobre metabólitos secundários e atividades biológicas de três cepas marinhas de *Trichoderma*. Pequim. Universidade da Academia Chinesa de Ciências, 2016.

LIU, Y.; HU, Z.; LIN, X.; LU, C.; SHEN, Y. A new polyketide from *Diaporthe* sp. SXZ-19, an endophytic fungal strain of *Camptotheca acuminata*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 22, p. 2100-2104, 2013.

LÖNNROTH, E.C. Toxicity of Medical Glove Materials: A Pilot Study. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics (JOSE)*, v.11, n.2, p.131–139, 2005.

LU, Y., XU, L., CONG, Y., SONG, G., HAN, J., WANG, G., CHEN, K. (Características estruturais e atividades anticancerígenas/antioxidantes de um novo polissacarídeo de *Trichoderma kangansenis*. *Polímeros de Carboidratos*. 2018.

MA, L.; WANG, S.; WANG, D.; PARSEK, M.R.; WOZNIAK, D.J. The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** n.65, p.377–380. 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre, **Artmed**, p. 1160, 2019.

MALVIYA, R; BANSAL, V.; PAL, O.P; SHARMA, P.K. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**. n.2:p. 2226. 2010.

MARQUES, L. G. A.; V.N. J. DE B. ; SALES, S. L. A. ; COSTA, P. M. DA S. ; GS, C. DE J; MANSO, M. P.;PEREIRA, J. V.DE M. ; P, C. DO . Ó. O impacto da bioprospecção para o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas. **Rev. Fitos**. Rio de Janeiro. 2022.

MEDEIROS, H. A.; ARAÚJO FILHO, J. V.; FREITAS, L. G.; CASTILLO, P.; RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; MONTE, E. Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40216, 2017.

MELO, L.F; DE A. CAMARA, C.A.G DA; OLIVEIRA, L.L.D; DA, S.S DE, MODESTO J.C.D.A, PÉREZ, C.D. **Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco.** Biotemas 2012 – 2020.

MELO, G. R. P.; **Atividade antimicrobiana de *Trichoderma* spp. de origem amazônica contra fungos e bactérias de importância médica.** Dissertação de mestrado em Biotecnologia - Universidade Federal do Amazonas. 2021.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**1982

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da **Trichoderma: uso na agricultura.**2019.

MILLÁN-ALMARAZ M, NIEVES-SOTO M, LÓPEZ-PERAZA D, PERAZA-YEE M. Effect of light and feed density on ingestion rate, protein and lipid content of *Artemia franciscana* juveniles. **Lat. Am. J. Aquat. Res.**2021

MCINTOSH C. H et a. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 38, p. 860-872, 2011.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, 65(1-2), 55–63.1983.

MOURA, F. P; BETIM, F. C. M; OLIVEIRA, C. F; DIAS , J. F. G; MONTRUCCHIO, D. P; MIGUEL, O. G; AUER, C. G; MIGUEL, M. D; **Atividade larvicida de extratos de *Diplodia pinea* frente à *Aedes aegypti*.** **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, 2021.

NASCIMENTO, A.M.; SOARES, M.G.; TORCHELSEN, F.K.V.S.; ARAUJO, J.A.V.;LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; ANDRADE, P.H.R.; RIBEIRO, T.G.; COELHO, E.A.F.;NASCIMENTO, A.M. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.31, n.11, p.1793–1800, 2013.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M; RUIZ, V.; BLANCO, J; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.. SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial. Pathog.**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NIETO JACOBO, M.; STEYAERT, J.; SALAZAR-BADILLO, F.; NGUYEN, D.; ROSTÁS, M.;BRAITHWAITE, M.; SOUZA, J.; JIMENEZ, J.; OHKURA, M.;

STEWART, A.; ArtemioEnvironmental Growth Conditions of Trichoderma spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Front. Plant Sci.* (2017).

NOTARTE, K.I.; YAGUCHI, T.; SUGANUMA, K.; CRUZ, TE DELA. Atividades antibacterianas, citotóxicas e tripanocidas de fungos marinhos isolados de macroalgas filipinas e ervas marinhas. *Acta Botânica Croatica*.2018.

NTUNGWE, E.N; MARTIN, E.M.D; ROBERTO, A.TAVARES, J; VERA. M.S. PEREIRA, P. CEBOLA, M.J; RIJO,P; Artemia species: An important tool to screen general toxicity samples. *Current Pharmaceutical Design*,Vol. 26, No. 24.2020.

O'CONNOR, S. E. Alkaloids. In: MANDER, L.; LUI, H. W. (Eds.). *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. **Oxford: Elsevier**, v. 1. p. 977-1007. 2010.

OLIVEIRA, M.C. Caracterização bioquímica e funcional de diguanilato ciclases de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2015. 267p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. OSBOURN, A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical Innovation. *Trends in Genetics*, v. 26, n.10, p. 449-459, 2010.

O'TOOLE, G.A; KOLTER, R. A motilidade flagelar e twitching são necessárias para o desenvolvimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.*Mol.Microbiol.* v.30, p.295-304. 1998.

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, BR; LIN, TJ; CHENG, Z. Resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa*: Mecanismos e estratégias terapêuticas alternativas.*Biotecnologia*. Av.,37,p. 177-192.2019.

PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: Action to combat the rising microbial challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 42, n. SUPPL.1, p. S25–S28, 2013.

PERCIVAL, S.L; MALIC, S.; CRUZ, H. et al. Introduction to biofilms. *Biofilm. Vet Med.* v. 6, p. 41-68, 2011.

PIMENTEL, M. F.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELA, S. T. & LOTUFO, L. V. C. O uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 6, n. 1, 2011. p. 15 – 22.

PINTO, Z. V. et al. A. Control of lettuce bottom rot by isolates of *Trichoderma* spp. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.2, p.141-146, 2014.

PIZZOLO, G.; SUZUKI, H.; VINANTE, F. Pro-apoptotic activity of α -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. *Journal of Translational Medicine* 2011.

RABUSKE, J. E.; *Trichoderma asperellum* no manejo de doenças e na promoção de crescimento de plantas de nogueira – peça . 2021.

RAHMAN, A.-; CHOUDHARY, M. I.; THOMSON, W. J. **Bioassay Techniques for Drug Development**. Singapore: Taylor & Francis e-Library, p. 240. 2005.

RAJAMANIKYAM; M. V. V. AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 2017.

RAMADA, M. H. S.; STEINDORFF, A. S.; BLOCH JR, C.; ULHOA, C. J. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, v. 16, n. 3, p. 477-490, 2016.

RAMOS, T. C. A. A; **Identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do Quadrilátero Ferrífero – MG**. Sete Lagoas/MG 2016.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. A Formação de Biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*: Uma Revisão dos Compostos Naturais e Sintéticos Interferindo nos Mecanismos de Controle. **BioMed Res. Int**. 2015.

RISDIAN, Chandra; MOZEF, Tjandrawati; WINK, Joachim. Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces*. **Microorganisms**, [S. l.], v.7, n.124, p.1-18, 9 maio 2019.

RITTMAN, B. E; Biofilms, Active substrata, and me. **Water Res.**, 2017.

ROBBERTSE, B.; STROPE P.K.; CHAVERRI, P.; GAZIS, R.; CIUFO, S.; DOMRACHEV, M.; SCHOCH, C.L. Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying one name one species in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea*. **Database**, 2017.

RODRIGUES, F. A; PIMENTA, V. S. C; BRAGA, E.G. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**. Centro Científico conhecer. Goiania. v.13, n.23, p. 870.2016.

RENDUELES, O. GHIGO, J. M.; Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36. p. 972-89. 2012.

SÁEZ, A.G.; ESCALANTE, R; SASTRE, L. High DNA sequence variability at the $\alpha 1$ Na/K-ATPase locus of *Artemia franciscana* (brine shrimp): Polymorphism in a gene for salt-resistance in a salt-resistant organism. **Mol Biol Evol**. 2000.

SAJADI, S. M; FARZAD, K. SHAHBAZFAR, A. A; TAYEFI, N.H; FAKHRI, D. A. Cytotoxicity of *Trichoderma Reesi* Extract in Hepa1-6 Cancer Cells. **Journal of Advanced Biomedical Sciences**. Winter Vol 12. 1.2022.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: Systematic, the sexual state and ecology. **Phytopathology**, v. 96, p. 195-206, 2006.

SANTOS, M. S.; ORLANDELLI, R. C.; POLONIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPFILE, J. A. Endophytes

isolated from passion fruit plants: molecular identification, chemical characterization and antibacterial activity of secondary metabolites. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 38-43, 2017.

SILVA, I. P. da. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 2014-2019.

SHOKRI, D., KHORASGANI, M. R., MOHKAM, M., FATEMI, S. M., GHASEMI, Y., & TAHERI KAFRANI, A. The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, 10, 34–42. 2018.

SOLTANI, J. Secondary metabolite diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances. In: Gupta. V. K. *Aspergillus System Properties and Applications*. **Elsevier**. B. V.; p. 275-292. 2016.

SONDERHOLM, M.; KRAGH, KN; KOREN, K.; JAKOBSEN, TH; DARCH, SE; ALHEDE, M.; JENSEN, P.O.; WHITELEY, M.; KÜHL, M.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* A formação de agregados em um sistema de modelo de grânulo de alginato exibe características semelhantes ao vivo. **Aplic. Ambiente. Microbiol.** 2017.

SONG, Y. P., MIAO, F. P., LIU, X. H., YIN, X. L., & JI, N. Y. Cyclonerane Derivatives from the Algicolous Endophytic Fungus *Trichoderma asperellum* A-YMD-9-2. **Marine drugs**, 17(5), p. 252. (2019).

STODDART MJ. Cell viability assays: introduction. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.). p. 1–6. 2011.

STROBEL, G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **J Fungi (Basel)**, v. 4, 2018.

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., & SVABIC-VLAHOVIC, M.A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, 40(2), p. 175–179. 2000.

STAPPEN, G. V. HÒA, N. V.; GAJARDO, G.; SORGELOOS, P.; ROCHA, R. D.; NYONJE, B.; TAMTIN, O.; SUI, L. Review on integrated production of the brine shrimp *Artemia* in solar salt ponds. **Reviews in Aquaculture**, Australia. v.12, n. 2, 18 p. 2019.

THI, M. T. T; WIBOWO, D; REHM, B. Review *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Rev. Int. J. Mol. Sci.** 2020.

THIRUMURUGAN, Durairaj et al. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In: *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. [S. l.]: Ramasamy Vijayakumar e Suresh S.S. **Raja**, cap. 1, p. 1-22. 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. FACULDADE DE MEDICINA. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA DA SAÚDE. Ginecologia e Obstetrícia. **Bioestatística quantitativa aplicada**/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.; Organizadores Edison Capp e Otto Henrique Nienow

– Porto Alegre: UFRGS, 2020.

VEIGA, L. F. & VITAL, N., Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. **Artes Gráficas e Indústria**, São Paulo, p.111-122. 2011.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

WANG, X.D., DENG, R.C., LIU, Y., LI, B., SHEN, H., OUYANG, H. AND XIAO, Z.P. Modification of MTT assay for precision and repeatability and its mechanistic implication. **Asian J. Chem.** 26(23), p. 8015–8018. 2014.

YIN, H. et al. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton**, v. 60, n. 1, p. 136-143, Jan. 2012.

ZEILINGER, S. et al. Metabolismo secundário em *Trichoderma*: A química encontra a genômica. **Fungal Biology Reviews**, Índia, v. 30, n. 2, pág. 74-92, 2016.
