

CÂMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE  
SANTILLO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

EVA APARECIDA PRADO DO COUTO

**ESTUDOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Aspergillus*  
*flavus* E *Paecilomyces variotii* ISOLADOS DO SOLO DO CERRADO GOIANO**

Anápolis-GO

2015

COUTO, Eva Aparecida Prado do

“Estudos de metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus flavus* E *Paecilomyces variotii* isolados do solo do cerrado goiano” / Eva Aparecida Prado do Couto – Anápolis, 2015.

89 folhas XVI figuras.

Orientadora: Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro.

Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Goiás, Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis 2015.

1. *Aspergillus flavus*. 2. *Paecilomyces variotii*. 3. Metabólitos Secundários. 4. Solo do Cerrado.

1. Título

ESTUDOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Aspergillus flavus* E  
*Paecilomyces variotti* ISOLADOS DO SOLO DO CERRADO GOIANO

**EVA APARECIDA PRADO DO COUTO**

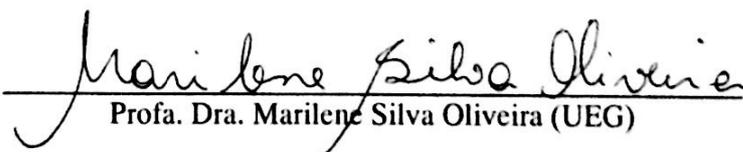
Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

Aprovada em 18/12/2015 por:



---

Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)



---

Prof. Dra. Marilene Silva Oliveira (UEG)



---

Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida (USP/Ribeirão Preto)

ANÁPOLIS – GO  
DEZEMBRO 2015

EVA APARECIDA PRADO DO COUTO

**ESTUDOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Aspergillus flavus* E *Paecilomyces variotii* ISOLADOS DO SOLO DO CERRADO GOIANO**

Dissertação de Mestrado apresentada á Banca examinadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

**Orientador (a):** Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro

Anápolis-GO

2015

## RESUMO

Os microrganismos representam uma importante fonte de compostos bioativos com alto valor econômico agregado. Apresentam uma série de vantagens em seu uso e produção. O objetivo deste trabalho foi isolar fungos do solo de Cerrado e identificar fungos com promissora fonte de compostos bioativos naturais, justamente por apresentarem uma diversidade estrutural que associado à grande variedade de microrganismos presentes na natureza, em especial aqueles que ainda não foram explorados, têm-se a probabilidade de manipulação das vias metabólicas da cultura. Inicialmente foram isolados e selecionados fungos do solo do Cerrado goiano com potencial de produção de metabólitos secundários com atividade biológica. A seleção dos 11 fungos isolados se deu previamente pela toxicidade em *Artemia salina* e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Sendo que 2 fungos apresentaram resultados prévios promissores frente aos demais. Estes fungos foram identificados a partir da extração do DNA e amplificação do gene 18S rRNA, como sendo *Aspergillus flavus* e *Paecilomyces variotii*. Foram extraídos os compostos destes fungos e realizado a avaliação do potencial biológico dos compostos produzidos pelos fungos *A. flavus* e *P. variotii* pela avaliação de toxicidade em *Artemia salina*, avaliação da susceptibilidade a antimicrobiano por disco-difusão e diluição, avaliação da concentração mínima inibitória e avaliação citotóxica pelo método de MTT. Foram realizadas as análises químicas dos compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de massa (CLAE – EM/EM) com intuito de elucidação dos compostos. Através deste trabalho foi possível verificar o potencial do solo do Cerrado goiano em fornecer fungos, bem como a utilização dos compostos produzidos pelo *A. flavus* e *P. variotii* com interesse industrial.

**Palavras-chave:** *Aspergillus flavus*, *Paecilomyces variotii*, Metabólitos Secundários, Solo do Cerrado.

## ABSTRACT

Microorganisms are an important source of bioactive compounds with high economic value and many advantages concerning their use and production. The objective of this study was to isolate fungi from Cerrado soil and identify those with a promising source of natural bioactive compounds, precisely because they have such a structural diversity. This, together with the wide range of microorganisms we can find in nature, particularly those that have not been exploited, allows us to manipulate the metabolic pathways of culture of the fungi. To begin with, fungi from the Cerrado soil in the state of Goiás were isolated and selected considering their potential production of secondary metabolites with biological activity. The selection of 11 isolated fungi happened previously due to the results of toxicity to *Artemia salina* and High-Performance Liquid Chromatography. Two species of fungi had had promising previous results compared to the other ones. These fungi were identified from the extraction of their DNA and amplification of their 18S rRNA gene, which featured *Aspergillus flavus* and *Paecilomyces variotii*. The compounds were extracted from these fungi, followed by an evaluation of the biological potential of the compounds produced by fungi *A. flavus* and *P. variotii* through the level of toxicity to *Artemia salina*, antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion and dilution and the minimum inhibitory concentration and cytotoxic evaluation by the MTT method. Chemical analyses of the compounds were done through High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and High-Performance Liquid Chromatography combined to Mass Spectrometry (HPLC - MS / MS) in order to elucidate the compounds. Through this study, it was possible to check the potential of the Cerrado soil in Goiás when it comes to providing fungi, as well as the use of compounds produced by *A. flavus* and *P. variotii* with industrial interest.

**Key-words:** *Aspergillus flavus*, *Paecilomyces variotii*, Secondary Metabolites, Cerrado soil.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Valdirene Neves Monteiro, que além da orientação desse trabalho, é sinônimo de paciência e humildade. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos por toda a sua contribuição intelectual, pessoal e profissional depositada durante esses anos.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação e a pós-graduação, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet, pela amizade, pelo convívio, paciência e apoio.

Aos meus pais, irmãos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradeço ao meu noivo que é sinônimo de amor, compreensão e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos: Fênix, Ailton, e Maurício pela ajuda ao longo do curso.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia – UFG, pela ajuda e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva e toda sua equipe pela auxílio nos experimentos e ajuda constante.

À Prof. Dr. Marilene Silva Oliveira pela contribuição ao longo da minha dissertação e ao Msc. Emerson Finco Marques da central Analítica do Instituto de Química IQ-USP São Paulo, pelas análises por espectrometria de massas.

À FAPEG pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena. O MEU MUITO OBRIGADA!

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da vegetação do Cerrado no Brasil.....	17
Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....	6343
Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura do fungo <i>Paecilomyces variotti</i> .....	44
Figura 4 - Cromatograma dos compostos produzidos pelo do isolado <i>A. flavus</i> (280 nm).....	48
Figura 5 - Cromatograma dos compostos produzidos pelo isolado <i>P. variotii</i> (280 nm) .....	49
Figura 6 - Cromatogramas dos compostos produzidos pelo fungo <i>A. flavus</i> . (A) - Cromatograma de íons totais (B) – Cromatograma em 280nm. (C e D) – Ampliação do Cromatograma ( A e B). .....	51
Figura 7 - Espectro de massas para o composto C1 produzido pelo fungo <i>A. flavus</i> . (A) – Espectro de massas do composto C1 com tempo de retenção de 22,4 min. (B) e (C) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A). .....	52
Figura 8 - Espectro de massas do composto C2 isolados do fungo <i>A. flavus</i> . (A) – Espectro de massas do composto C2 com tempo de retenção de 25 min. (B) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).. .....	53
Figura 9 - Espectro de massas do composto C3 isolados do fungo <i>A. flavus</i> . (A) – Espectro de massas do composto C3 com tempo de retenção de 26.9 min. (B), (C) e (D) – Espectro de massas do íons fragmentos do cromatograma (A).....	54
Figura 10 - Espectro de massa do composto C4 isolados do fungo <i>A. flavus</i> . (A) – Espectro de massas do composto C4 com tempo de retenção em 30.1 min. (B) e (C) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).....	55
Figura 11 - Espectro de massa do composto C5 isolados do fungo <i>A. flavus</i> . (A) – Espectro de massas do composto C5 com tempo de retenção em 30.1 min. (B) e (C) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).....	56
Figura 12 - Cromatogramas dos compostos produzidos pelo fungo <i>P. variotii</i> . (A) - Cromatograma de íons totais (B) – Cromatograma em 280nm. (C e D) – Ampliação do Cromatograma (A e B).....	57
Figura 13 - Espectro de massa do composto C6 isolados do fungo <i>P. variotii</i> . (A) – Espectro de massas do composto D1 com tempo de retenção de 22.6 min. (B) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).....	58
Figura 14 - Espectro de massa do composto C6 isolados do fungo <i>P. variotii</i> . (A) – Espectro de massas do composto D2 com tempo de retenção de 29.3 min. (B) e (C) – Espectro de massas do íons fragmentos do cromatograma (A).....	59
Figura 15 – Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos pela técnica de microdiluição.....	63

Figura 16: Percentual de efeito citotóxico dos compostos isolados por <i>A. flavus</i> (Nº 6) e <i>P. variotii</i> (Nº 4) frente a células de melanoma na linhagem A375.....	72
Figura 17: Percentual de efeito citotóxico dos compostos isolados por <i>A. flavus</i> (Nº 6) e <i>P. variotii</i> (Nº 4) frente a células de melanoma na linhagem WM1366.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos isolados do solo do cerrado, sequenciados parcialmente para o gene 18S rDNA, e identificação por homologia com sequências deste gene para os fungos contidos no banco de dados ( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ).....	41
Tabela 2 – Toxicidade dos compostos isolados dos fungos expressada como concentração letal para 50% (CL <sub>50</sub> ) das larvas de <i>Artemia salina</i> .....	66
Tabela 3 - Susceptibilidade dos compostos dos fungos <i>A. flavus</i> e <i>P. variotii</i> contra a cepa de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e MRSA.....	68
Tabela 4 - Resultados da Viabilidade celular das bactérias <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e MRSA frente aos compostos extraídos dos fungos <i>P. variotii</i> e <i>A. flavus</i> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA - Agar Batata Dextrose

CETAB - Cetil Trimetil Amônio Brometo

CL - Concentração Letal

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CP – Controle Positivo

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FC – Fator de Correção

LB – Meio Líquido Ágar

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

MTT - Método Colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia

PEG - Polietilenoglicol

PT – Poços de Teste

TBE – Tris, Borato e Edetato dissódico

UFC – Unidade formadora de Colônia

UV - Ultravioleta

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS.....	13
Objetivo Geral.....	14
Objetivos específicos: .....	14
CAPÍTULO I.....	15
1.1    O bioma Cerrado.....	16
1.1.1 O bioma Cerrado como Fonte de Microrganismos .....	18
1.2    A bioprospecção .....	20
1.3 O Potencial dos Microrganismos .....	21
1.4 Os Fungos .....	22
1.4.1 Os fungos e suas características .....	23
1.4.2 Os fungos e sua organização no Reino Fungi .....	26
1.4.3 Os fungos filamentosos .....	27
1.4.4 Os fungos <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Paecilomyces variotii</i> .....	28
1.4.5 Metabólitos secundários .....	30
1.5 Técnicas de Identificação de Compostos.....	31
1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	31
1.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1.6 Técnicas de Bioensaios .....	32
1.6.1 Toxicidade.....	33
1.6.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	33
1.6.3 Teste de susceptibilidade.....	34
CAPÍTULO II.....	35
1.1. Seleção dos Fungos da Reserva Ecológica .....	36
1.2. Cultivo e Manutenção dos Fungos e Obtenção dos Extratos Brutos. ....	37
1.3.1. Extração de DNA .....	37

1.3.2. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) .....	38
1.3.3. Purificação do Amplificado do Gene 18s RDNA .....	38
1.4. Análise das Características Microestruturais dos Fungos MSC 267 e MSC 61 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	39
2.1. Seleção dos Fungos da Reserva Ecológica .....	40
2.2. Identificação dos Fungos por Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região 18s RDNA .....	41
2.3. Análise Das Características Microestruturas Dos Fungos <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Paecilomyces variotii</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	42
CAPÍTULO III .....	45
1.1. Extração dos Compostos.....	46
1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
CAPÍTULO IV .....	60
1.1. Teste de Letalidade em <i>Artemia salina</i> .....	61
1.2. Susceptibilidade a Antimicrobiano por Disco-Difusão .....	61
1.3. Susceptibilidade a Antimicrobiano por Diluição .....	62
1.4. Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	62
1.5.1. Ensaio de atividade mitocondrial.....	64
2.2. Teste de Susceptibilidade a Antimicrobiano.....	67
2.3. Concentração Mínima Inibitória – CMI .....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	73
Referências Bibliográficas.....	75
Anexos.....	84

# INTRODUÇÃO

Até meados do século XIX, os fungos, objetivo de estudo desta pesquisa, não tinham uma divisão taxonômica específica. Havia, até então, apenas dois Reinos: Animalia e Vegetalia (ou Plantae). Nos dias de hoje, é impossível pensar em divisões tão generalizadas, já que a geração à qual pertencemos apenas conheceu e teve acesso a um campo de conhecimento muito maior do que o que muitos cientistas tiveram contato durante toda a sua vida em séculos passados.

Os fungos, até a época supracitada, eram considerados vegetais. Mesmo após o reconhecimento da diferença entre seres eucariontes e procariontes, apenas as bactérias (que até então eram tidas como vegetais também) foram retiradas do Reino Vegetalia.

Algum tempo mais tarde, depois de estudos mais aprofundados, percebeu-se que os fungos tinham características muito peculiares, e que não poderiam ser considerados plantas, uma vez que eles possuem paredes celulares de glicano e quitina combinados, e não celulose, além de outras diferenças assertivas entre eles e os pertencentes ao Reino Plantae.

Logo após o advento do Reino Fungi, a Micologia, ou o estudo dos fungos, surgiu como um ramo da Botânica. Isto nos permite inferir que, mesmo após a divisão taxonômica, os fungos ainda foram tratados como parte do Reino Plantae por algum tempo.

Com o avanço dos estudos acerca do comportamento dos representantes do Reino Fungi, percebeu-se a diversidade e a grandiosidade das possibilidades de aplicação dos metabólitos secundários dos fungos, e é exatamente por isto que a ideia desta pesquisa surgiu. Ademais, a necessidade econômica do estudo dos fungos é eminente. É a partir deles e de seus metabólitos que são fabricados antimicrobianos, os quais são utilizados em larga escala, tanto no tratamento a pacientes quanto em aplicações industriais. Destarte, temos que a pesquisa que aborda o aumento da abrangência do conhecimento já existente sobre os metabólitos secundários dos fungos e suas decorrentes aplicações é um passo importante para o melhoramento do arcabouço científico acerca do tema. As consequências disso tendem a ser sempre positivas, haja vista a inclinação ao desejo da aplicação prática do conhecimento acadêmico, para que ele não fique restrito ao ambiente no qual foi produzido.

Para que entendamos como todo o percurso da pesquisa se deu, é importante destacar que a mesma foi feita no Cerrado goiano, uma vez que ele é o segundo maior bioma do país e está presente no local onde a pesquisadora reside. Assim, foi mais fácil conduzir o estudo.

Faz parte da pesquisa uma breve descrição deste bioma e quais microrganismos, dentro da enorme gama de possibilidades, foram escolhidos para os experimentos. Logo após, introduzimos a questão da bioprospecção e sua importância para a condução deste estudo, já

que se reconhece a enorme riqueza genética presente nos microrganismos e, mais especificamente, nos fungos.

As principais espécies de fungos presentes neste trabalho são *Aspergillus flavus* e *Paecilomyces variotii*, pela grande possibilidade de aplicações das mesmas. Além disso, o vislumbre do interesse comercial como fonte de protótipos de novas moléculas bioativas fortaleceu o desejo de que o presente estudo fosse pautado nas questões já apresentadas.

Para tanto, foram realizados testes de bioensaios e de identificação de compostos, a fim de que houvessem resultados seguros, sempre com a preocupação da possibilidade de aplicação dos mesmos em âmbito comercial para que o grande público tenha acesso aos achados do estudo e se beneficie dos mesmos.

# **OBJETIVOS**

## **Objetivo Geral**

Selecionar e identificar fungos isolados do solo do Cerrado Goiano produtores de compostos bioativos com possível potencial terapêutico.

## **Objetivos específicos:**

- Selecionar e identificar os fungos isolados na reserva ecológica da Universidade Estadual de Goiás;
- Analisar o perfil dos compostos extraídos entre os fungos isolados;
- Avaliar a estrutura química dos compostos produzidos pelos isolados selecionados utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos por determinação da concentração mínima inibitória e toxicidade;
- Avaliar o potencial citotóxico dos extratos em células de linhagens cancerígenas humanas.

# CAPÍTULO I

*Este capítulo apresenta os referenciais teóricos da pesquisa, tendo em vista os principais conceitos e as concepções que envolvem a bioprospecção de fungos do bioma Cerrado. Para tanto, apresentamos inicialmente características referentes ao Cerrado, em especial no contexto brasileiro e discutimos, ainda, o potencial desse bioma como fonte de microrganismos. Em seguida, apresentamos considerações teóricas sobre o procedimento de bioprospecção no cenário de desenvolvimento de processos biotecnológicos. Temos como foco a bioprospecção de fungos, conforme objetivos da pesquisa. A seção seguinte aponta para o potencial dos microrganismos como fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. Na seção que se segue, apresentamos postulações sobre os fungos. Discutimos a importância desses microrganismos, suas características, sua organização no Reino Fungi e fazemos, ainda, uma abordagem mais específica sobre os fungos filamentosos. Por fim, consideramos importante apresentar sobre Técnicas de identificação de compostos e Testes de biosensaíos.*

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 O bioma Cerrado

Em todos os ecossistemas do planeta, assim como em ambientes agrícolas, os microrganismos são peças fundamentais na ciclagem de nutrientes. Os microrganismos vivem nos mais variados habitats da terra, e essa habilidade é devido à sua diversidade metabólica, isto é, diferentes micróbios podem usar uma variedade de fontes de energia e crescer sob diferentes condições físicas. A diversidade de populações microbianas indica que elas tiram proveito de qualquer nicho encontrado em seu ambiente (BORNEMAN e TRIPLETTI, 1997; MOUTINHO, 2002).

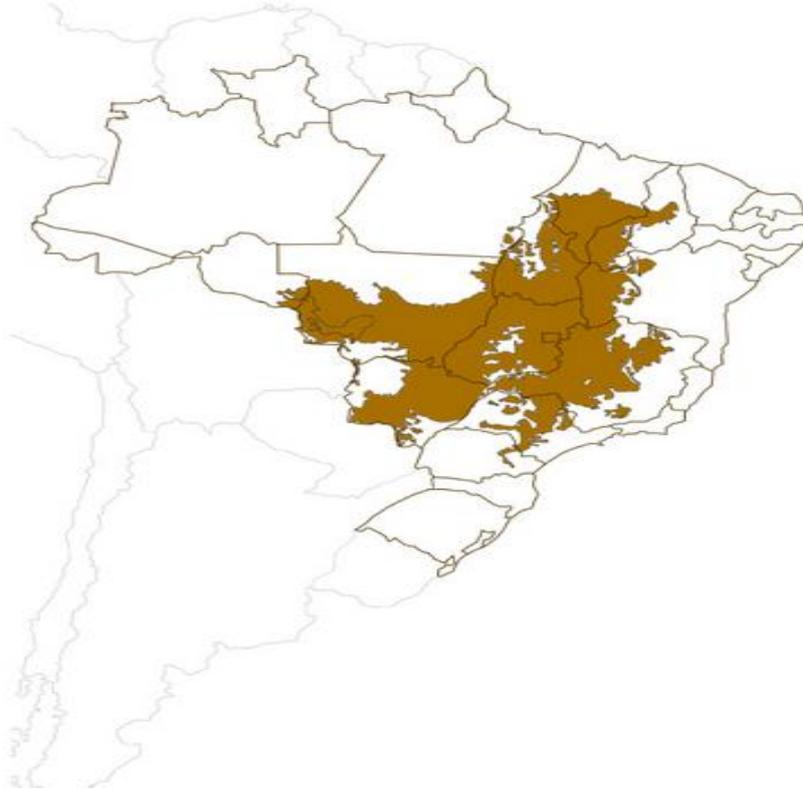
O Brasil apresenta diversos ecossistemas florestais, não florestais, aquáticos, montículos, costeiros e marinhos (RIBEIRO, WALTER, 1998). Um desses biomas é o Cerrado, que apresenta uma grande variedade de sistemas ecológicos decorrentes de uma combinação peculiar de condições edáficas e climáticas que, somados ao relevo e à altitude, originam uma vegetação diversificada (EITEN, 1994).

Ainda sobre a formação do Cerrado, temos que ele é “o segundo maior bioma da América do Sul, sendo superado apenas pela Floresta Amazônica, [o bioma] é um ambiente em mosaico, formado por diferentes fitofisionomias” (MONTEIRO, 2012, p. 16).

Este bioma está localizado basicamente no Planalto Central do Brasil e é o segundo maior bioma do país em área, superado, novamente, somente pela Amazônia, representando entre 20 e 25% do território nacional, ocupando mais de 2 000 000 km<sup>2</sup> (KLINK, MACHADO, 2005).

Caracteriza-se pela presença de invernos secos e verões chuvosos, com uma precipitação média anual da ordem de 1500 mm, variando de 750 a 2000 mm. Ocorre em altitudes que variam entre cerca de 300 m e mais de 1600 m. Abrange os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo e também ocorre em áreas disjuntas ao norte nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima e, ao sul, em pequenas “ilhas” no Paraná. Fora do Brasil ocupa áreas na Bolívia e Paraguai, enquanto paisagens semelhantes são encontradas na Colômbia, Guiana, Suriname e Venezuela, conforme mostra a Figura 1 (ALMEIDA JR., 1993; RIBEIRO, WALTER, 1998; PIRES, 1999; ÁVILA, 2001; COUTINHO 2002).

Figura 1 – Distribuição da vegetação do Cerrado no Brasil



Fonte: Ratter, Ribeiro e Bridgewater (1997).

A maior parte do cerrado se localiza no Planalto Central Brasileiro que compreende regiões de elevadas altitudes, na porção central do país. Nesse território, encontram-se as nascentes de três grandes bacias hidrográficas do continente sul-americano – Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata –, o que resulta numa grande disponibilidade de recursos hídricos (MENDONÇA et al., 2008). Desse modo, o espaço geográfico ocupado pelo bioma Cerrado exerce papel importante no processo de distribuição dos recursos hídricos pelo país. Tal fenômeno é conhecido como “efeito guarda-chuva” (LIMA, 2011).

O termo *Cerrado* é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (KLINK; MACHADO, 2005). Ao conceituar o bioma Cerrado, Coutinho (2006) expõe que os biomas são também chamados de formações ou complexos. Podem ser conceituados como um agrupamento de fisionomia homogênea e independente da composição florística. Tal agrupamento se estende por uma área bastante extensa, que é controlada pelo clima regional.

Na comunidade terrestre os biomas correspondem às principais formações vegetais naturais. Mas, vale ressaltar, conforme colocações de Coutinho (2006), que o conceito de bioma não depende da vegetação florística, mas de sua fisionomia. Um mesmo bioma pode ter floras diferentes e grande similaridade florística entre duas comunidades, o que não significa que pertençam a um mesmo tipo de bioma.

Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo (MENDONÇA et al., 2008). Esse bioma apresenta uma riqueza biológica estimada em 160.000 mil espécies de plantas e animais, que corresponde a 5% da flora e fauna mundial. Além disso, apresenta caracteristicamente uma vegetação peculiar, com verões quentes e chuvosos e invernos suaves e secos, por outro. A precipitação média é de 1.500mm. Suas temperaturas variam em média de 22°C a 27°C (PEIXOTO et al., 2010).

Portanto, o Cerrado brasileiro é considerado um *hotspot* por apresentar tamanha diversidade de espécies endêmicas (MONTEIRO, 2012). Mesmo representado uma parte tão significativa da fauna e flora brasileiras, este bioma ainda conta com poucas pesquisas a seu respeito, o que dificulta a obtenção de um conhecimento mais amplo em relação a suas características e, conseqüentemente, o aproveitamento de tal conhecimento em aplicações práticas e acadêmicas.

Os solos do Cerrado exibem específicas características comuns, como elevada acidez, deficiência de nutrientes, altos teores de alumínio e alta capacidade de fixação de fósforo (GUCKER; BOECHAT; GIANI, 2009). Apesar de sua grande importância ecológica e econômica, pouco se sabe sobre a biodiversidade do Cerrado, especialmente sobre a diversidade microbiana do solo (CASTRO et al., 2008).

#### 1.1.1 O bioma Cerrado como Fonte de Microrganismos

O Cerrado é uma unidade ecológica típica da zona tropical, que compõe um grande conjunto de terras adequadamente ocupadas e integradas no contexto socioeconômico do Brasil. No entanto, grandes áreas estão sendo desmatadas em todo o país para a prática de monoculturas agrícolas (NOVAES et al., 1993). Muitas áreas de cerrado apresentam subsolo pobre em nutrientes e matéria orgânica, com as propriedades físicas comprometidas, distantes das condições naturais para esse bioma, devido à utilização de produtos químicos resultante da atividade agricultura (RODRIGUES et al., 2007).

De grande importância, o cerrado faz parte dos 25 *hotspots* mundiais, justamente por conter tamanha biodiversidade. Há um número muito grande de espécies nestas áreas, sendo elas endêmicas, ameaçadas ou raras, o que faz com que requeiram prioridade na tentativa de conservação. Estas áreas são, ainda, caracterizadas pela ação antrópica de forma desregulada, tais qual o desmatamento, para servir à indústria agropecuária, uma vez que esta é a principal atividade econômica dos estados em que o bioma é localizado. Essas transformações no Cerrado trouxeram vários danos ambientais, como a fragmentação de habitats e a extinção da biodiversidade (KLINK et al., 2005).

Para Lima (2011), um solo de Cerrado possui, em média, apenas 3% de matéria orgânica, sendo que 5% dessa pequena quantidade são formadas por seres vivos. Desse total, 70% representam os microrganismos. O restante é constituído pelas raízes das plantas e pela macro, meso e micro fauna do solo: insetos, protozoários, etc. Nessa dinâmica, a parte viva e mais ativa da matéria orgânica do solo é formada, em sua maioria, pelos microrganismos, os quais são responsáveis pelo funcionamento do solo. Conforme o mesmo autor, sem essa parte viva, o solo seria meramente uma mistura de areia, silte e argila.

Mesmo considerando a riqueza da composição do solo, já que ela é real e comprovável, é de desconhecimento do grande público como os microrganismos são fatores importantes no aspecto geral da diversidade biológica. Tal desconhecimento seja, talvez, a razão pela qual esta diversidade macrobiana ainda não tenha sido elucidada por completo.

Os microrganismos são elementos fundamentais na ciclagem de nutrientes em todos os ecossistemas do planeta, bem como em ambientes agrícolas. Tal processo biológico viabiliza bases científicas para a compreensão de reações bioquímicas pelas quais os compostos orgânicos são levados a compostos inorgânicos, sendo estes elementos constituintes chamados de mineralização. Nesse processo, os microrganismos são essenciais para realizações de transformações químicas (ATLAS; BARTHA, 1993; SALAMANCA; RAUBUCH; JOERGENSEN, 2002).

Acerca disso, Mendes e Reis Júnior (2010) afirmam que os fungos se associam com raízes de plantas, com mútuo benefício, como as micorrizas. Moreira e Siqueira (2006) complementam ao afirmar que as plantas micorrizadas possuem maior capacidade de absorção e, por isso, geralmente acumulam maiores quantidades de macro e micronutrientes. Nas raízes micorrizadas, hifas e micélios externos crescem solo adentro e aumentam a área de exploração do solo, além de permitir a absorção de nutrientes que estão fora da zona de esgotamento que surge ao redor das raízes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

No que diz respeito aos aspectos ecológicos e biológicos, Crestana et al. (2004) afirma que a regeneração natural é o sistema mais eficiente e econômico para restaurar a vegetação com espécies do cerrado. Em áreas degradadas, compactadas, com solos desgastados ou erodidas, com baixa resiliência, o recomendado é o sistema de recuperação artificial por meio da revegetação.

## 1.2 A bioprospecção

Segundo Saccaro Júnior (2012),

[u]ma das formas de extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção. Ela pode ser definida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral (coletivamente chamados de recursos genéticos) que possam, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto. É relevante para uma ampla gama de setores e atividades, incluindo biotecnologia, agricultura, nutrição, indústria farmacêutica e de cosméticos, biorremediação, saúde, entre outros. Para a agricultura, por exemplo, a busca por genes em espécies silvestres pode levar à criação de novas variedades de plantas alimentícias, adaptáveis a condições socioambientais diversas, contribuindo para a segurança alimentar do futuro.

Desta forma, tem-se que este processo é fundamental nos dias de hoje, uma vez que se busca preservar, melhorar e entender as espécies já conhecidas e catalogadas e descobrir as que ainda não puderam sê-lo.

A bioprospecção constitui um dos estágios iniciais de um projeto de biotecnologia. Esta, por sua vez, é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. A procura e descoberta de um fenômeno biológico que possa ser explorado é o passo inicial em um projeto biotecnológico, tão crucial quanto qualquer outra etapa nesse processo (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do(s) melhor(es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções, e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Nesse processo, a bioprospecção se apresenta como um dos estágios iniciais da pesquisa biotecnológica, que é finalizado uma vez que o composto, organismo ou característica desejável tenha sido encontrado.

Atualmente, os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagem em relação aos processos químicos convencionais (BISPO, 2010). As práticas de bioprospecção proliferam na medida em que companhias farmacêuticas e de biotecnologia em geral se engajam em coletar e selecionar recursos biológicos e genéticos por todo o mundo (DEDEURWAERDERE, 2005). O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais (BISPO, 2010).

O conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização desses organismos na busca de soluções nas áreas alimentícias, saúde, meio ambiente e industrial vem crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (OLIVEIRA, K. F. et al., 2006).

O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado com a diversidade dos microrganismos e das moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário, bem como com a conservação dos recursos genéticos que eles fornecem. Conseqüentemente, o aumento da diversidade de compostos químicos para os diferentes setores industriais está associado com a exploração da diversidade microbiana e são muitos os benefícios científicos esperados como resultado dessa exploração (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998; OLIVEIRA, K. F. et al., 2006).

O isolamento e a identificação de microrganismos a partir de fontes naturais tem sido uma ferramenta proficiente na obtenção de estirpes aplicáveis e geneticamente estáveis (ADNAN; TAN, 2007). A bioprospecção de fungos entomopatogênicos pode permitir a localização de espécimes com grande patogenicidade e virulência e com capacidade enzimática para as mais diversas aplicações, além de possibilitar a descoberta de novas espécies com recursos bioquímicos de interesse comercial (SANTOS et al., 2009).

### **1.3 O Potencial dos Microrganismos**

Os microrganismos vivem nos mais variados habitats da terra. Essa habilidade deve-se à sua diversidade metabólica, isto é, diferentes microrganismos podem usar uma variedade de fontes de energia e se desenvolver sob diferentes condições físicas e químicas. A diversidade

de populações microbianas indica que elas tiram proveito de qualquer nicho encontrado em seus ambientes. Assim sendo, os microrganismos detêm a maior proporção da diversidade genética global estimada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

Possuindo alta variabilidade metabólica e a capacidade de realizar interações com as estruturas físicas e químicas do solo, os microrganismos atuam no controle biológico de patógenos, por meio de associações simbióticas com as raízes. Podem também influenciar na solubilização de minerais e auxiliar a estruturação e agregação do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

São responsáveis pela ciclagem dos compostos químicos, incluindo a degradação de poluentes ambientais, e, por conseguinte, são essenciais para o meio ambiente e para a estabilidade dos ecossistemas. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados (ROSSELÓ-MORA; AMMAN, 2001; STURSA et al., 2009).

Por apresentarem uma notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética, os microrganismos tornaram-se uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. São muitos os exemplos de utilização dos recursos microbianos pelo homem em diversas atividades de importância socioeconômica. Na área industrial são empregados na produção de compostos comerciais ou para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado. Na agropecuária, destacam-se os microrganismos fixadores de nitrogênio e os empregados no controle biológico de pragas e vetores. Já na área ambiental, as perspectivas estão fundamentadas na biorremediação, tratando-se de uma técnica bastante promissora e dependente de novos isolados (KURTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004).

Os microrganismos, portanto, movimentam bilhões de dólares a cada ano na indústria, por apresentarem alto potencial e valor agregado pela sua aplicação direta nos processos biotecnológicos. Além disso, estão associados aos benefícios ambientais e sociais decorrentes do tratamento de resíduos industriais e da poluição ambiental (KURTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004; OLIVEIRA K.F. et al., 2006).

#### **1.4 Os Fungos**

Os fungos constituem um grupo de microrganismos localizados em todos os nichos ecológicos. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies e destas apenas cerca de 74 mil foram descritas (MENDES; REIS JÚNIOR, 2010). São microrganismos ubíquos e sua

dispersão na natureza pode ocorrer por meio de animais, homens, insetos, água e, principalmente, pelo vento. Já foram descritos aproximadamente 80.000 espécies de fungos, sendo a maioria benéfica ao homem (menos de 50 espécies causam 90% das infecções fúngicas em seres humanos e animais). (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Encontrados na natureza, os fungos, são essenciais aos processos de degradação e reciclagem de matéria orgânica. Alguns têm participação na produção de alimentos e bebidas alcoólicas e outros têm importância na medicina, pois, apesar de estarem associados à causa de determinadas doenças, são utilizados na produção de medicamentos, como antibióticos (penicilinas) e imunossupressores (ciclosporina) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Nesse sentido, os fungos exercem um relevante papel na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas por meio da decomposição de matéria orgânica, ciclagem e transporte de nutrientes, uma vez que têm a capacidade de decompor matéria vegetal morta e reciclar elementos vitais pelo uso de enzimas extracelulares como a celulase. Grande parte das plantas depende das simbioses com fungos, conhecidas como micorrizas, que servem para auxiliar as raízes das plantas a absorverem minerais e água do solo. Sabe-se que eles possuem grande relevância econômica para as indústrias alimentícia, farmacêutica e para a agricultura (MORAIS et al., 2014; GREVE et al., 2010).

#### 1.4.1 Os fungos e suas características

A maior parte dos fungos constitui um corpo vegetativo filamentosos conhecido como micélio que se ramifica em todas as direções. Cada uma destas ramificações é chamada de hifa que normalmente apresenta espessura uniforme, de 2 a 10mm de diâmetro e tem a capacidade para alcançar 100mm em alguns fungos (RODRIGUES; MALTONI; CASSIOLATO, 2007). A extensão do micélio é de poucos micrômetros, podendo chegar até alguns metros (MONTEIRO et al., 2012). As hifas podem, ou não, apresentar partições delimitadas pelas transversais chamadas septos. As que apresentam septos são reconhecidas como septadas. Já aquelas que não possuem são asseptadas. (ARAÚJO et al., 2010).

Os fungos podem ser filamentosos, constituídos por filamentos longos e ramificados denominados hifas; podem ser leveduriformes, constituídos por células individuais que se reproduzem por brotamento ou fissão binária; ou dimórficos, podendo ser filamentosos ou leveduriforme dependendo das condições ambientais, principalmente da temperatura (ARAÚJO et al., 2010; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Quanto ao ciclo de vida, os fungos se diferem dos animais e plantas não sendo obrigatório, mas sim, facultativo. Desse modo, caso as condições do meio sejam ideais para o crescimento somático (vegetativo), esse crescimento ocorrerá. Em laboratório é possível manter fungos vivos na sua forma micelial ou leveduriforme por grande período de tempo. Contudo, diante de uma redução acentuada de nutrientes disponíveis, é possível ocorrer uma sequência de etapas de desenvolvimento que pode conduzir à esporulação (OLIVEIRA, 2008).

A reprodução dos fungos se dá por meio de esporos, sendo estas estruturas reprodutivas constituídas de uma ou mais células. Quanto à estrutura, os esporos se formam assexuadamente, produzidos por mitoses (mitósporos), as quais podem se apresentar sob os tipos: conídios, esporângios, clamidósporos ou artrósporos. O primeiro grupo é produzido a partir das hifas, em estruturas chamadas conidióforos. O segundo possui estruturas em forma de saco, sendo que seu conteúdo se converte através de clivagem em um ou vários esporos (CHAPLA, 2014).

Os esporos que têm a capacidade para nadar e se utilizam de flagelos são chamados de zoósporos. Os esporangióforos são imóveis e são conhecidos como aplanósporos. Em certos tipos de fungos, as células das hifas aumentam e adquirem forma arredondada sendo que os mesmos possuem parede espessa. Ao separarem-se formam clamidósporos. Já os artrósporos resultam da fragmentação da hifa, em fungos hifais ou gemas em fungos leveduriformes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

A reprodução sexuada envolve dois citoplasmas – processo esse conhecido como plasmogamia –, a união de núcleos denominada de cariogamia e, ainda, a meiose, responsável pela produção de esporos conhecidos como meiósporos, os quais podem ser dos tipos basidiósporos, ascósporos ou zigósporos. Esses esporos são produzidos por hifas diferenciadas denominadas, respectivamente, zigosporângios, ascos e basídios. Os basidiósporos são produzidos por fungos do grupo dos *Basidiomycetes*, os ascósporos são produzidos por fungos do grupo dos *Ascomycetes*, e os zigósporos por fungos do grupo dos *Zygomycetes* (ARAÚJO et al., 2010; AGRIOS, 2005).

Os fungos retêm nutrientes por meio da membrana plasmática, como compostos de baixo peso molecular dissolvidos em água, justificando tal necessidade. Para realizar tal processo, esses organismos secretam enzimas específicas para o meio exterior e conseguem reduzir o tamanho das moléculas aumentando a sua solubilidade. (HARGREAVES, 2008)

Essas substâncias passam pela membrana, que faz a seleção para que as moléculas pequenas possam recebê-las. Embora algumas enzimas façam parte de sua composição, elas poderão incorporar, de modo ativo, certos nutrientes por seleção. Assim, essas moléculas simples terão preferência na sua utilização como nutrientes, sendo que nesse momento ocorre a síntese de enzimas para moléculas mais complexas. (FURBINO, 2012)

Ao versar sobre o assunto, Putzke (2002) assevera que, se houver glicose no meio, a qual é preferida pelo fungo, não serão formadas as enzimas para degradar substratos complexos, como amido e celulose, nem enzimas para degradar dissacarídeos, como galactose, maltose e sacarose.

Da mesma maneira como ocorre nas plantas, de um modo geral, os fungos também precisam de duas classes de nutrientes conforme a quantidade necessária em suas dietas. É o caso dos macronutrientes, que são exigidos em quantidades por volta de  $10^{-3}M$  e os micronutrientes, os quais requerem quantidades por volta de  $10^{-6}M$  ou menos. (PUTZKE, 2002). Ainda de acordo com Putzke (2002), são classificados como macronutrientes: carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio. O primeiro macronutriente é mais exigido por ser um elemento estrutural, unido ao hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Os micronutrientes constituem um grupo como: ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio.

Os fungos também são biodegradadores naturais, pois neles se encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, como as macromoléculas insolúveis, que necessitam ser primeiramente degradadas em unidades monoméricas solúveis antes de sua assimilação. Existem substâncias como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lipídios e outros compostos de grande peso molecular, ou insolúveis, que não podem ser incorporados inteiramente sem antes terem sido reduzidos (MORAIS; YOSHIMOTO; RHODEN, 2014).

No meio ambiente, os fungos são importantes agentes de decomposição em florestas, como, por exemplo, os fungos celulolíticos e ligninolíticos que liberam nutrientes para as plantas. Algumas espécies são usadas no controle biológico de pragas, parasitando nematoides (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Entretanto, os fungos podem causar danos econômicos, ao agir na destruição de madeira em postes, estradas de ferro, navios e casas e de outros materiais, como tecidos, lentes e discos. Ao provocar doenças em plantas, podem chegar a causar, em alguns casos, extinção de espécies em escala regional.

#### 1.4.2 Os fungos e sua organização no Reino Fungi

Os fungos são organizados dentro do Reino Fungi e se encontram subdivididos nos Filos *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. O primeiro apresenta células móveis em certas fases de desenvolvimento do talo. Constituem-se em organismos relacionados a ambientes úmidos ou aquáticos, tais como rios, lagos, solos úmidos e em alguns casos, ambientes salobros e marinhos. O Filo *Chytridiomycota* constitui uma classe única conhecida como *Chytridiomycetes*, que é formada por cinco ordens: *Spizellomycetes*, *Neocallymasticales*, *Chytridiales*, *Blastocladales* e *Monoblepharidales* (AGRIOS, 2005).

A constituição do filo *Zygomycota* ocorre pelas classes *Zigomycetes* e *Trichomycetes*. Nesse filo não existem esporos, flagelos e nem centríolos. Os *Zigomycetes* são caracterizados pela produção do esporo de resistência de origem sexual, conhecido como zigósporo. Algumas espécies são úteis na fabricação de produtos industriais como enzimas, pigmentos, ácidos orgânicos, entre outros (SIQUEIRA, 2011).

A classe *Trichomycetes* é um grupo de organismos abundantemente inconspícuos, sendo que todos os membros estão associados com artrópodes vivos, de modo particular do meio aquático. Certas espécies produzem grandes colônias no intestino dos animais, com aspecto de pelos o que justifica seu nome (SILVA; COELHO, 2006).

O filo *Basidiomycota* abriga aproximadamente 25 mil espécies catalogadas. Dentre elas, estão espécies de extrema relevância para o homem, a exemplo de cogumelos comestíveis, espécies com potencial para biorremediação e espécies com alta atividade lignolítica e celulolítica, importantes para ciclagem de nutrientes. Ademais, muitas espécies são patógenas de plantas e de animais.

O Filo *Ascomycota* constitui o maior número de espécies dentre todos os filios do Reino Fungi, com aproximadamente 35 mil espécies conhecidas, distribuídas entre parasitas, simbiontes e saprófitos. Muitas delas são utilizadas em benefício humano, como *Saccharomyces cerevisiae* nos processos de fermentação e *Penicillium chrysogenum* na produção de antibióticos. Outras espécies estão ligadas diretamente a perdas econômicas, como, por exemplo, espécies parasitas de planta, *Giberella spp.* e *Claviceps spp.* (ARAÚJO et al., 2010).

Existem também os fungos que vivem em associação com espécies vegetais. Eles são classificados como epifíticos, fitopatógenos, endofíticos e os da micorriza. Os epifíticos são aqueles que vivem na superfície do material vegetal; os fitopatógenos são causadores de

doenças; os endofíticos são os que se localizam dentro dos tecidos vegetais; e os da micorriza são fungos que se localizam em raízes (SANTOS, et al., 2013).

#### 1.4.3 Os fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são microrganismos particularmente interessantes, uma vez que a demanda por enzimas de uso industrial, sobretudo aquelas com origem microbiana, é crescente em razão de sua aplicação numa grande variedade de processos biotecnológicos. Reações mediadas por enzimas têm sido excelentes alternativas a métodos químicos, geralmente poluentes. Os catalisadores são muito utilizados em diferentes áreas, como indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, papelarias, ração animal, têxteis e cosméticas e na produção de biocombustível, o etanol (FURBINO, 2012).

Dentre um grande número de microrganismos não patogênicos capazes de produzir enzimas úteis, os fungos filamentosos se destacam devido à sua facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para sua liberação (POLIZELI et al., 2005).

Conforme Tortora et al. (2002), os fungos filamentosos são formados e constituídos a partir de estruturas de frutificação que germinam dando origem a tubos germinativos que crescem, formando as hifas ou filamentos. As hifas podem ou não ser septadas, sendo que esta última é conhecida como hifa cenocítica. O septo serve para promover a individualização das células que compõem as hifas. Desse modo, no segmento intermediário de dois septos têm-se uma célula e, conseqüentemente, um núcleo.

Embora o septo esteja presente, a individualização não acontece plenamente, pois os septos apresentam poros interligados ao citoplasma de uma célula com outra. No tocante às hifas cenocíticas, essas são visualizadas como uma estrutura contínua composta de vários núcleos. Tortora et al (2002) afirma que o crescimento da hifa acontece por meio do alongamento de suas extremidades. Em condições ideais, as hifas proliferam formando uma massa fibrosa denominada micélio.

A organização em hifas desempenha funções relevantes para o crescimento da colônia. Aquelas nomeadas como hifas vegetativas ocupam o papel de obtenção de nutrientes. Já os esporos têm função reprodutiva (LIMA, 2011).

#### 1.4.4 Os fungos *Aspergillus flavus* e *Paecilomyces variotii*

Estas espécies de fungos são as mais conhecidas pertencentes à família *Trichocomaceae*.

##### 1.4.4.1 *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* foi catalogado pela primeira vez em 1729 e, desde então, já descobriram-se mais de 260 que fazem parte dele. Os fungos deste gênero são reconhecíveis pelos “seus perfis de metabólitos secundários, coloração dos conídios, por sua taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água e através de seu crescimento no meio de cultura Creatine Sucrose Agar – CREA” (SAMSON; VARGA, 2009 *apud* MONTEIRO, 2012, p. 27)

Ainda sobre o gênero *Aspergillus*, é possível afirmar que se trate de um cosmopolita, com grande distribuição na natureza, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical (KLICH, 2002; PITT; HOCKING, 1997)

As espécies mais conhecidas e, portanto, estudadas, são *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri*, muito provavelmente por terem certa importância econômica, uma vez que produzem micotoxinas. Por conseguinte, muitos isolados são usados na fabricação de produtos diversos. Contudo, apesar da grande utilização econômica, as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* são causadoras de doenças em várias plantas, ou seja, são patógenos oportunistas, em várias fases da produção. (KLICH, 2002; VARGA *et al.*, 2004)

Utilizando-nos de uma taxonomia mais precisa, temos que a espécie *Aspergillus flavus* pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales e família *Trichomaceae* (KIRK *et al.*, 2008).

*Segundo Reis (2009, p. 9),*

[s]eus conidióforos surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou a partir da métula que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A cabeça conidial (vesícula, métula, fiálides e cadeias de conídeos) [...] em *A. flavus* é variável (KOKALIS-BURELLE *et al.*, 1997). Em sua fase teleomórfica, *A. flavus* é denominado *Petromyces flavus* (HORN *et al.*, 2009a) pela formação de múltiplos ascocarpos não estiolados dentro da matriz

pseudoparenquimatosa do estroma (MALLOCH e CAIN, 1972; HORN *et al.*, 2009b)

Como mencionado anteriormente, esse gênero de fungos produz micotoxinas. Uma das mais amplamente estudadas é a aflatoxina, produzida por *Aspergillus* da seção *flavi*, mais especificamente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Essa micotoxina é uma das mais comuns em relação à contaminação de produtos agropecuários devido às parcas condições climáticas, de produção e armazenamento. Com isso, há efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. (KLICH, 2000; HUSSEIN; BRASEL, 2001; KUMAR *et. al.*, 2008; ZAIN, 2001 *apud* MONTEIRO, 2012)

#### 1.4.4.2 *Paecilomyces variotii*

A espécie *Paecilomyces variotii*, também pertencente à família *Trichomaceae*, classe Ascomycetes, tal qual *A. flavus*. Esta classe, pelo que se apresenta na literatura disponível acerca da mesma, é denominada como contendo “fungos superiores”, devido à sua estrutura, que é mais complexa que a da maioria dos outros fungos (PELCZAR, 1996 *apud* DAMÁSIO, 2008). Além disto, “[e]sta é uma classe diversificada e economicamente importante, que compreende dezenas de milhares de espécies”. (DAMÁSIO, 2008, p. 21)

O fungo *Paecilomyces variotii*, de acordo com sua caracterização peculiar, tem colônias de rápido crescimento quando expostas à temperatura ambiente, além de uma coloração específica, marrom-amarelada e superfície pulverulenta.

Ainda a respeito de sua morfologia, tem-se que, além de serem filamentosos, os espécimes de *P. variotii*

[a]presentam conidióforos ramificados, fiálides em grupos ou solitárias terminando em uma elongação cilíndrica e de tamanhos variáveis. Os conidióforos hialinos são de parede lisa, marrom-amarelados em massa, variáveis em forma e tamanho, que podem ser elipsoidais, cilíndricos ou clavados. Os clamidósporos estão presentes em grande quantidade. Esta espécie é termotolerante e consegue crescer em ambientes extremos, é comum no ar, no solo, em madeira e alimentos. (DAMÁSIO, 2008, p. 21)

Por ser facilmente encontrado, *P. variotii* é tido como agente oportunista, que causa micoses em pacientes com imunidade baixa ou comprometida, além de ser responsável pela

deterioração do couro, cosméticos, emulsões farmacêuticas e óleos vegetais. (HOUBRAKEN *et al.*, 2010; SAMSON, 1974 *apud* GASSEN, 2012)

#### 1.4.5 Metabólitos secundários

Embora os produtos naturais tenham sido empiricamente usada nas antigas populações humanas (BASSETT *et al.*, 1980), foi apenas no Século XX que se passou a identificar e caracterizar sistematicamente estes compostos importantes (LANGFELDER *et al.*, 2003). Os produtos naturais têm sido de grande interesse porque a sua aptidão para o tratamento de doenças infecciosas, cancro, como agentes imunossuppressores, e, finalmente, como um fonte persistente de agentes terapêuticos novos e inovadores e leads de drogas (NEWMAN; CRAGG, 2007). Um grande número destas moléculas de baixo peso molecular são produzidos estruturalmente por complexos microrganismos, em particular por bactérias que vivem nos solos e fungos. Isto não é uma surpresa tendo em conta que estes organismos vivem em ecossistemas complexos onde competem e se comunicam com outros, que vão desde as bactérias, os fungos e as algas protozoários e metazoários mesmo (GOH *et al.*, 2002;. LOSADA *et al.*, 2009; BRAKHAGE, SCHROECKH, 2011).

Muitos metabólitos apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios em outros organismos, esse fato, se justifica, pois em seus habitats necessitam competir com outros microrganismos, o que garante a sua sobrevivência (KHALDI *et al.*, 2010). Em decorrência a essas propriedades bioativas, muitos destes têm sido adotados para o uso farmacêutico como os antibióticos, agentes hipocolesterolemiantes, inibidores tumorais e imunossuppressores, sendo que, poucos metabólitos secundários de sucesso não apresentam atividade antibiótica (DEMAIN, 1999; SHWAB; KELLER, 2008).

Microrganismos são hábeis em produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários que podem ser utilizados em diversas aplicações apresentando uma importante fonte de compostos bioativos para agroquímica e farmacologia (COLLEMARE *et al.*, 2008; CRANEY; AHMED; NODWELL, 2013). Metabólitos secundários são definidos como compostos de baixo peso molecular que não são requeridos para o crescimento do organismo sendo caracterizados pela grande diversidade de estrutura química e variação de forma em diferentes condições ambientais conferindo uma vantagem seletiva ao organismo produtor (BUTLER; BUSS, 2006). Vários metabólitos secundários com estruturas e atividades biológicas vêm sendo isolados de diferentes organismos e vários estudos vêm sendo feitos

para compreender e caracterizar a via Biosintética levando a descoberta de novos compostos (COLLEMARE et al., 2008). A produção de metabólitos secundários varia de acordo com o composto específico, a espécie, a presença de outros microrganismos e o balanço entre a biossíntese de elicitores e a taxa de biotransformação (DEGENKOLB; BRÜCKNER, 2008; VINALE et al., 2009).

Metabólitos secundários podem ser considerados um largo e heterogêneo grupo de moléculas não essenciais para o crescimento, mas apresentando um importante papel na sinalização, desenvolvimento e interação com outros organismos (MUKHERJEE et al., 2012).

A evolução destes chamados metabólitos secundários sobre milhões de anos foi provavelmente realizado porque microrganismos usaram-nos como sinais químicos para a comunicação, para defender o habitat ou para inibir o crescimento de concorrentes. Embora numerosos produtos naturais tenham sido identificados durante as últimas décadas, é óbvio que uma pletera de compostos ainda espera a descoberta (BRAKHAGE, SCHROECKH, 2011).

## **1.5 Técnicas de Identificação de Compostos**

Segundo Lopes (2011), para a correta triagem e identificação, química e físico-química, de novos compostos, é necessário que a busca pelos mesmos independa de suas atividades biológicas. Primeiramente, deve-se separar os compostos de um extrato mais complexo por meio de métodos cromatográficos. Mais adiante, é necessário analisar por métodos espectroscópicos a reatividade química e/ou propriedades físico-químicas dos compostos. Dentre estes métodos, temos a espectrometria de massas (MS em inglês e EM em português) e a ressonância magnética nuclear (RMN).

### **1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Este tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, repletas de materiais (sólidos rígidos, semi-rígidos ou não rígidos; partículas porosas ou peculiares; partículas esféricas ou irregulares; partículas com diferentes diâmetros) preparados especifica e especialmente para tanto e uma fase móvel eluída sobre altas pressões. É capaz de separar e analisar quantitativamente grandes quantidades de compostos presentes em tipos variados e diferentes de amostras em poucos minutos e em alta resolução, além de conferir eficiência e sensibilidade ao resultado final. Portanto, pode-se afirmar que nenhum registro

cromatográfico contemporâneo pode ser considerado completo se não incluir a CLAE, já que ela é um instrumento poderoso e versátil para a separação de produtos naturais em matrizes complexas tais quais extratos brutos polares. (COLLINS & GUIMARÃES, 1988; SKOOG & LEARY, 1992; GOUVEA, 2010)

### 1.5.2 Espectrometria de Massas (EM)

Como trataremos de metabólitos secundários neste trabalho, temos que um dos métodos mais eficazes para que se trace um perfil de metabólitos produzidos é a espectrometria de massa (EM). Neste método, extratos de fungos são diretamente injetados em um espectrômetro de massas, utilizando-se a técnica de ionização por electrospray. (LOPES, 2011)

A espectrometria de massas é uma técnica de análise poderosa para identificação de compostos desconhecidos, quantificação de materiais conhecidos e elucidação das propriedades químicas e estruturais de moléculas. A vantagem deste método é que pode ser realizado com quantidades bem pequenas e a concentrações bem baixas em misturas complexas, além de servir a uma grande gama de profissionais, como físicos, engenheiros de controle de processos, químicos, entre outros. (AZEVEDO, 2004)

### 1.6 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)

As principais formas de realização de bioensaios são: análise de toxicidade, concentração mínima inibitória e teste de susceptibilidade.

### 1.6.1 Toxicidade

Há grande preocupação acerca dos impactos das atividades humanas em ecossistemas aquáticos. Portanto, como resultado, a demanda por tecnologias mais avançadas para detecção rápida e segura dos possíveis riscos aumentou significativamente. Isso se dá pelo fato de que análises químicas isoladas não são mais suficientes no que chamamos boas avaliações de risco, especialmente no que concerne ao monitoramento de efluentes industriais com o intuito de minimizar o impacto ambiental causado pela ação humana, substâncias químicas, manufaturadas ou provenientes de outros materiais (antropogênicos ou naturais) em organismos aquáticos. (PIMENTEL *et al.*, 2011)

Os testes de toxicidade compreendem os experimentos feitos para verificação de efeitos adversos manifestados por organismos-teste: alterações genéticas, imobilidade, deformidade ou letalidade, podendo ser eles agudos ou crônicos (CHAPMAN, 2002; PIMENTEL *et al.*, 2011)

### 1.6.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

De acordo com Madigan, Martinko e Parker (2003 *apud* EMBRAPA, 2009),

define-se agente microbiano como sendo um produto químico natural ou sintético que mata ou inibe o crescimento de microrganismos; o antibiótico, dentro da classe dos agentes microbianos, é substância química necessariamente produzida por um microrganismo, que mata ou inibe o crescimento de outro microrganismo.

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.

Após a incubação, os tubos são inspecionados, verificando-se a ocorrência de um crescimento visível (turbidez). O tubo contendo a menor concentração do agente capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo define a CMI. (EMBRAPA, 2009, p.7)

### 1.6.3 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)

## CAPÍTULO II

*Nesse capítulo será abordada a prospecção, isolamento e identificação de fungos isolados do solo da Trilha Interpretativa de Educação Ambiental “Trilha do Tatu”, do Campus de Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), em Anápolis-GO.*

## 1. METODOLOGIA

### 1.1. Seleção dos Fungos da Reserva Ecológica

Os fungos do estudo foram coletados na reserva ecológica do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás - CCET/UEG no município de Anápolis - Goiás (Latitude: -16° 23' 0.4194'' Longitude: -48° 56' 37.7874''). As amostras de solo coletados foram de cinco pontos distintos em uma região de 5 m<sup>2</sup>, cerca de 200g/ponto. As amostras foram recolhidas a partir dos primeiros 10 cm abaixo da superfície, peneiradas (10 Mesh) e transferidas para um frasco estéril. Em seguida, foram acondicionadas a 4°C, segundo metodologia descrita por Castilho et al. (2006).

O isolamento dos fungos a partir de amostras de solo foi realizado através da técnica convencional das diluições seriadas em placas, descrita por Menezes et al. (2004), com adaptações. A técnica de isolamento foi feita pela homogeneização de 10 g de amostra de solo em 90 mL de solução salina 0,85 % (p/v) estéril em frascos de Erlenmeyer de 250 mL (diluição 10<sup>-1</sup>). A suspensão foi misturada em agitador mecânico (Shake), a 150 rpm por 30 minutos, a temperatura ambiente. A segunda diluição (10<sup>-2</sup>) foi realizada transferindo-se 1mL da diluição 10<sup>-1</sup> para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,85 % (p/v) estéril, e assim sucessivamente até a diluição 10<sup>-7</sup>. As amostras foram plaqueadas em dois diferentes meios de cultivo: BDA (2% de glicose, 2% de ágar, qsp. 20mL de caldo batata para 100 mL) e MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar), todos contendo 150 mg.L<sup>-1</sup> de antibiótico ampicilina.

As diluições 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup> foram utilizadas para análise do perfil morfológico de fungos, sendo retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição e inoculada em triplicata na superfície do meio ágar BDA, espalhando-se homogeneamente com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28°C, por 7 dias. As colônias com características morfológicas de fungos foram transferidas para o meio de manutenção MYG, pela técnica de esgotamento por estrias em placa para posterior obtenção das culturas puras. As estirpes purificadas foram mantidas na forma de suspensão de células/espores em glicerol 30 %, a temperatura de - 40 °C (HOPWOOD et. al, 1985).

## **1.2. Cultivo e Manutenção dos Fungos e Obtenção dos Extratos Brutos.**

Os fungos foram mantidos a 4° C em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar).

Discos de 3 mm de diâmetro originados de placas dos isolados dos fungos foram repicados periodicamente para novas placas de Petri contendo meio MYG. Após a esporulação do fungo, foi adicionado aproximadamente 4mL de salina 0,9% (p/v) estéril. O sobrenadante coletado foi utilizado como fonte de esporos. A contagem dos esporos foi realizada visualmente com auxílio de um microscópio em uma câmara de Neubauer.

Soluções esporos na concentração de  $1 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> de cada um dos fungos foram inoculados em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio TLE (CaCl<sub>2</sub> 0,1g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,0 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0 g L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g L<sup>-1</sup>, Bactopeptona g L<sup>-1</sup> e 0,1 mL de solução elementos traços). Os frascos contendo cada um dos fungos foram incubados em agitador rotatório à 28°C a 120 rpm no escuro por 7 dias.

Após esse período, os meios foram filtrados a vácuo e o filtrado (extrato bruto) foi submetido a extração por partição líquido-líquido com acetato de etila.

## **1.3. Identificação dos Fungos (Microrganismos do Solo do Cerrado (MSC) 267 e MSC 61) por Sequenciamento do DNA**

### **1.3.1. Extração de DNA**

O fungos foram cultivados separadamente em meio ágar MYG a 180 rpm, 28°C por 48 horas para a obtenção de micélio. O DNA fúngico foi extraído a partir de micélio congelado e liofilizado através da metodologia proposta por Raeder e Broda (1985) acrescida de tampão CETAB (Brometo Cetil Trimetil Amônio).

A certificação da eficácia da extração de DNA foi realizada por meio da análise por gel de eletroforese. Os DNA extraídos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão de corrida TBE 1X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e tampão de amostra. A eletroforese foi desenvolvida em tampão TBE 1X (Tampão para Eletroforese 1X Concentrado) a 90 V por 40 minutos.

O gel de agarose foi corado com brometo de etídio 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> e lavado com água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas em transluminador UV acoplado a um

sistema de fotodocumentação *MultiDoc-it*<sup>®</sup>(UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1kb DNA Ladder<sup>®</sup>(BIOLABS).

### 1.3.2. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

O DNA extraído de cada fungo foi amplificado utilizando a técnica de PCR para a amplificação da região 18S rDNA dos fungos selecionados segundo a técnica modificada por Arturo et al. (1995). Para a amplificação do gene 18S rDNA do material genético extraído dos fungos selecionadas, foram utilizados os seguintes “primers” ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') seguindo o protocolo descrito por WHITE et al. (1990) (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991).

A região ITS1-5.8S e ITS2 foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando a combinação dos primers em volume final de 25 µL contendo 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada dNTP, 3 µM de MgCl<sub>2</sub>, 5 pmols de cada oligonucleotídeo, 1,5 U/µL de Taq-polimerase, tampão da enzima 1x e 11,75 µL de água mili-q estéril. A reação em cadeia de polimerase foi conduzida em termociclador programado para realizar desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94 °C por 45 seg, 50 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min e 30 seg, respectivamente) e um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min. Após a amplificação, 5µL da reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1x corado com Brometo para visualizar um fragmento de aproximadamente 565 e 613 pares de base (HENRY, IWEN, HINRICHS, 2000).

Os fragmentos obtidos na amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão de corrida TBE 1X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e tampão de amostra FSUDS (azul de bromofenol 0,25% SDS 0,1%, Ficoll<sup>®</sup> 20% em T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>) como descrito acima. Para a visualização das bandas amplificadas, estas foram coradas e fotografadas conforme a metodologia descrita no item anterior.

### 1.3.3. Purificação do Amplificado do Gene 18s RDNA

Para a purificação da reação de PCR da região 18S rDNA com volume final de 50 µL foram acrescentados 50 µL de polietilenoglicol (PEG), sendo que a mistura foi incubada por 15 min a 37°C, em seguida centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao restante foram adicionados 125 µL de etanol 80%. Após 10 minutos os tubos

foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra final foi seca a temperatura ambiente por 4 horas para total evaporação do etanol seguida da ressuspensão do precipitado em 250µL de TLE (IKEDA, 2010).

O produto de purificação foi utilizado na reação de sequenciamento utilizando um DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados no aparelho ABI prisma 3100 (Applied Biosystem). A reação de sequenciamento foi realizada em triplicata.

#### **1.4. Análise das Características Microestruturais dos Fungos MSC 267 e MSC 61 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Discos de cultura de 5 mm foram retirados das placas após 72 horas de crescimento e fixados em solução à base de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 por 12 horas a 4° C. Após a fixação o material sofreu quatro lavagens em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 e foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato em uma proporção 1:1 por 1 hora. Todas as amostras foram envolvidas em papel alumínio para que ficassem ao abrigo da luz. Posteriormente, o material sofreu uma série de quatro lavagens com tampão cacodilato 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,2 e, em seguida, foi desidratado em série aquosa de acetona a concentração de 30, 50, 70, 85, 95 e 100%. O material permaneceu por 15 minutos em cada uma das concentrações, sendo que para a concentração final de 100% o material recebeu duas lavagens de 10 minutos cada. Logo após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico, utilizando-se o equipamento de secagem ao ponto crítico Balzers CPD 030 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein). Em seguida o material foi vaporizado com ouro, durante 150 segundos, usando-se o “SputterCoater” Balzers SCD 50 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein), completando-se assim o preparo do material para observação ao MEV. As eletromicrografias foram realizadas no LabMic/UFG com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol, modelo JSM-6610 (JeolLtda, Tóquio, Japão).

## **2. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **2.1. Seleção dos Fungos da Reserva Ecológica**

O solo do cerrado tem-se uma imensa fonte de biodiversidade que são os microrganismos, dentre eles destaca-se os fungos, estes são vitais para o bom funcionamento do ecossistema, sendo responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, ciclagem dos nutrientes, crescimento das plantas, contribuindo para a fertilidade e estrutura do solo (PREEM et al., 2012; WANG et al., 2014). Os fungos possuem enorme capacidade metabólica para produzir grande diversidade de metabólitos bioativos (LI e VEDERAS, 2009).

A partir da metodologia descrita por Menezes et al. (2004), foi possível selecionar 11 isolados que receberam a denominação MSC (Microrganismos do Solo do Cerrado) (tabela 1). Inicialmente todos os fungos isolados nesse trabalho tiveram sua toxicidade avaliada a partir dos compostos produzidos por eles e que estão discutidos no capítulo IV. A separação dos compostos químicos dos isolados foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) bem como a toxicidade desses compostos foram os fatores determinantes na escolha dos fungos MSC 267 e MSC 61 para esse trabalho. Por uma questão de ordem da sequencia metodológica, ou seja, isolamento dos fungos, identificação desses por sequenciamento do DNA e microscopia eletrônica de varredura que foram os tópicos abordados nesse capítulo e metodologias de extração, produção, isolamento dos compostos químicos e identificação dos compostos produzidos pelos fungos com técnicas de CLAE e espectrometria de massas tratados no capítulo III e por fim avaliação do potencial tóxico dos compostos produzidos pelos isolados discutidos no capítulo IV. Dessa forma a escolha dos isolados MSC 267 e MSC 61 será compreendido ao longo dos capítulos.

## 2.2. Identificação dos Fungos por Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região 18s rDNA

Após o sequenciamento das amostras, a análise foi realizada pelo “blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os resultados obtidos entre as sequências amplificadas e as sequências descritas no banco de dados mostraram similaridade de 100% indicando alta confiabilidade para os resultados (Tabela 1).

**Tabela 1** - Fungos isolados do solo do cerrado, sequenciados parcialmente para o gene 18S rDNA, e identificação por homologia com sequências deste gene para os fungos contidos no banco de dados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Pares de bases		Similaridade		
Isolados	(pb) sequenciados	Espécies	Acession n°	%ID
MSC 267 ITS1	623	<i>Paecilomyces variotii</i>	<a href="#">FJ345354.1</a>	100
MSC 267 ITS4	689	<i>Paecilomyces variotii</i>	<a href="#">FJ345354.1</a>	100
MSC 61 ITS1	544	<i>Aspergillus flavus</i>	<a href="#">KP340003.1</a>	100
MSC 61 ITS4	651	<i>Aspergillus flavus</i>	<a href="#">KP340003.1</a>	100

Os isolados foram sequenciados com os primers ITS 1 e ITS 4, apresentando similaridade alta com os gêneros *Aspergillus* e *Paecilomyces*.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados cosmopolita e amplamente distribuídos na natureza, o isolamento de espécies em solos e em plantas caídas é muito comum. Estão relacionados com o processo de biodeterioração nos alimentos estocados e industrializados, nos processos de industrialização de alimentos e na produção de antibióticos e ácidos. São produtores de várias enzimas, as quais em sua maioria são utilizadas industrialmente como aditivos alimentares (BATISTA, 2007).

Na natureza o *Aspergillus* é capaz de crescer em um amplo espectro de diferentes fontes de nutrientes. É predominantemente um fungo saprófita e cresce em tecido vegetal e animal em estado de decomposição no solo. Por esse motivo, é muito importante na reciclagem de nutrientes. Muitas espécies podem ser patogênicas oportunistas a diversas espécies de plantas e animais, incluindo seres humanos e animais domésticos (MARASAS;

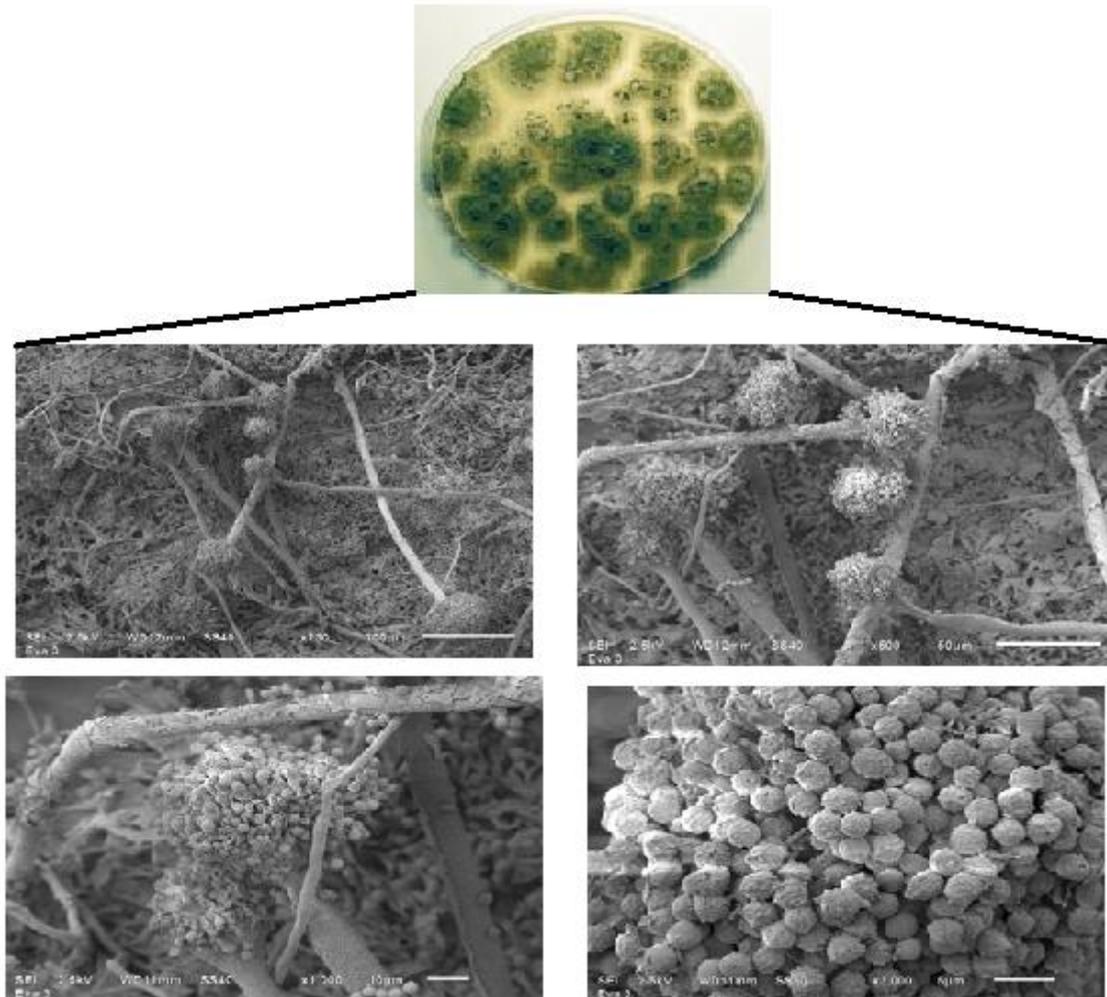
NELSON, 1987; BALDISSERA et al., 1993; PERRONE et al, 2007). Além disto, o gênero é provavelmente o mais produtor de micotoxinas. Mais de vinte espécies de *Aspergillus* produzem micotoxinas, porém as mais comuns são as da divisão flavi, que incluem três espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Vaamonde et al, 2003; Saleemullah et al, 2006).

As quatro aflatoxinas naturalmente produzidas são B1, B2, G1, G2; sendo que a B1 é usualmente encontrada em grandes concentrações contaminando alimentos. A nomenclatura de B e G é derivada da fluorescência azul e verde fluorescente produzido sob a luz UV em placas cromatográficas. Aflatoxina B1 é o componente mais tóxico para o fígado de animais e humanos (RITTER, 2007).

O gênero *Paecilomyces* apresenta espécies entopatogênicas com potencial no controle de insetos (ALVES, 1998). A estirpe de fungos *Paecilomyces variotii* é um fungo sapróbio, isolado do solo e de vários substratos das regiões áridas e quentes, conhecido por produzir vários metabólitos secundários com atividades biológicas potentes, tais como cornexistin, paecilocins, derivados de semiviriditoxin, e ácido tricarbóxico. Possui importância pela produção de ácidos, antibióticos e proteínas, além de infectar alguns pacientes humanos devido a sua característica oportunista (LAI et al., 2015).

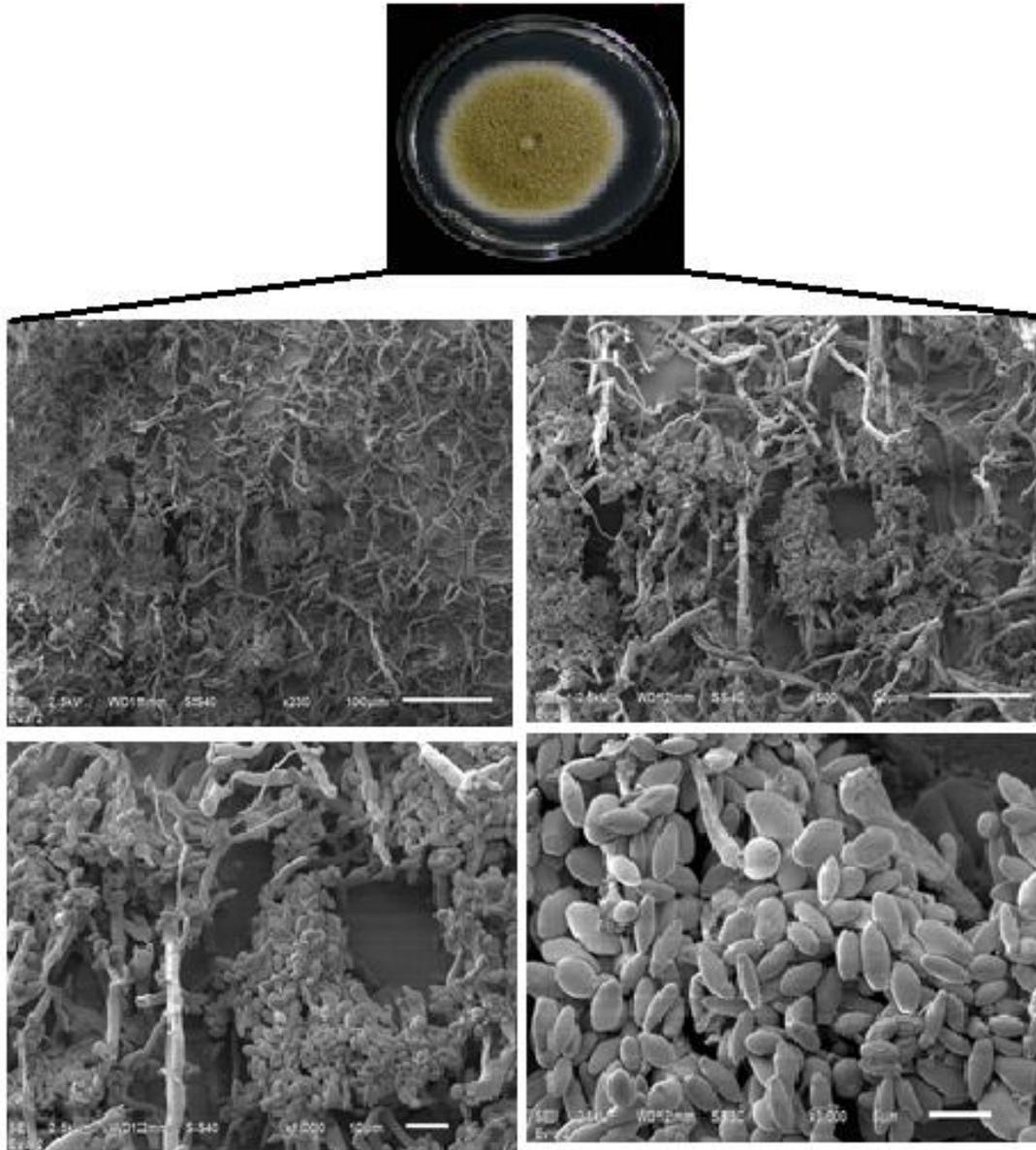
### **2.3. Análise Das Características Microestruturas Dos Fungos *Aspergillus flavus* e *Paecilomyces variotii* por Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para avaliar a morfologia dos isolados identificados por sequenciamento do DNA foi realizado a microscopia eletrônica de varredura. A morfologia do gênero *Aspergillus*, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo a principal característica macroscópica utilizada para classificação, sendo encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (KLICH, 2002; VARGAS et al, 2004). Apresenta microestruturas que corroboram com o descrito por Martins e colaboradores (2005) “caracteriza-se por ter o conidióforo com haste longa, grossa, vesícula globosa coberta com uma camada de fiálides seguida de conídios em cadeia que formam cabeças conidiais radiadas, com 300 µm a 400 µm de diâmetro e as fiálides são unisseriadas ou bisseriadas. Os conídios são globosos e equinulados” (Figura 2).



**Figura 2-** Microscopia eletrônica de varredura do fungo *Aspergillus flavus*

O fungo previamente denominado MSC 267, foi sequenciado e demonstrou alta similaridade com o fungo *Paecilomyces variotii*, resultado este que foi comprovado pelas suas microestruturas a partir da técnica do MEV, que apresentam hifas septadas, as fiálides são cilíndricas ou forma elipsoidal, que se ampliam a partir da base. Em seguida, diminuem para um ramo fino que se assemelham a um pino de boliche. Conídios são subsférica ou forma elipsoidal, liso murado e cerca de 2-4 mm por 3-5 mm de tamanho. Conídios geralmente surgem em longas cadeias divergentes, típicos do fungo *P. variotii* (Figura 3).



**Figura 3-** Microscopia eletrônica de varredura do fungo *Paecilomyces variotti*

## CAPÍTULO III

*Nesse capítulo serão abordados os procedimentos metodológicos os resultados e discussões para a parte do trabalho relacionada às análises dos compostos produzidos por *A. flavus* e *P. variotii* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de massa (CLAE - EM/EM).*

## **1. METODOLOGIA**

### **1.1. Extração dos Compostos**

Os filtrados (extratos brutos), a parte orgânica, dos fungos isolados foram submetidos à extração por partição líquido-líquido com acetato de etila. Para isso os compostos de interesse foram extraídos com adição de acetato de etila (1:2) por três vezes, a fim de otimizar a extração, também foi adicionado NaCl 1,5M. 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 e seco por speed vac.

### **1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Após a liofilização do material, 200µg de cada amostra de fungo foi ressuspensionado em acetonitrila 5% + água (p/v) em concentração final de 200µg·mL<sup>-1</sup>, e submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE/RF), em uma coluna analítica Wide-Pore (C18 5µM 250 mm X 4,6 mm). Os eluentes foram a solução A (TFA 0,1% em água MiliQ) e solução B ( TFA 0,1% em acetonitrila). Fluxo de 1,2 mL/min.. O gradiente de concentração de B foi de 10% (v/v) durante 5 minutos, variou de 10% (v/v) a 90% (v/v) em 50 minutos e estabilizou em 90% (v/v) por mais 5 minutos. A detecção foi realizada em comprimento de onda (280 nm) previamente definido a partir do espectro de varredura dos compostos realizados no espectrofotômetro UV/VIS.

### **1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE – EM/EM).**

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna C18 (250 X 4,6 mm 5µm) como fase estacionária, e como fase móvel água Milli-Q (A) acetonitrila com 0,5% de ácido fórmico (B), com gradiente de eluição de 10% de (B) por 5 min, 10-90% de (B) em 40 min, 90-10% de (B) até 60 min, com fluxo de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. Foi utilizado um CLAE da Shimadzu com detector de UV-VIS.

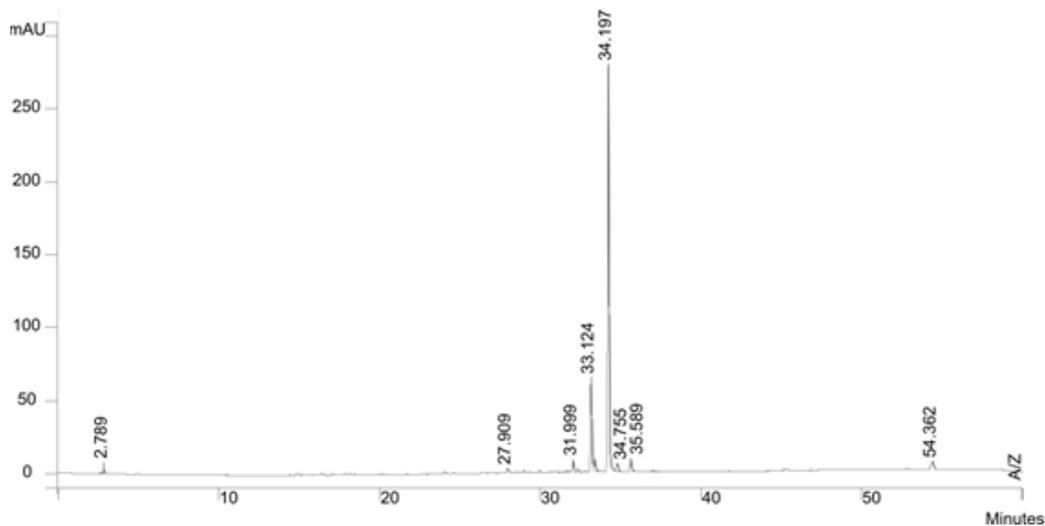
As amostras foram submetidas a análises por ESI<sup>+</sup>-EM/EM sendo que o fluxo proveniente do CLAE foi dividido por um splitter resultando em fluxo de 25 µL.min<sup>-1</sup>, do cromatógrafo para dentro do espectrômetro. As análises foram feitas em um espectrômetro

ESI-Q-TOF Bruker Daltonics MaXia 3G com fonte de electrospray mano capitiva, nas seguintes condições: capilar, 1,8 kV, temperatura de secagem, 1500 °C , gás de secagem, 6 L.min<sup>-1</sup>. As condições de ionização por electrospray foram capilar, 2,5 kV, temperatura de secagem, 1800 °C, gás de secagem, 4,0 L.min<sup>-1</sup>. O gás de colisão utilizado foi nitrogênio e a energia foi otimizada de 5 a 40 eV, sendo que a energia utilizada foi 30 eV. O software para aquisição dos dados e processamento foi o Bruker Data Analysis versão 4.0. As análises por espectrometria de massas foram realizadas em colaboração com o Msc. Emerson Finco Marques, na central Analítica do Instituto de Química IQ-USP, USP, São Paulo.

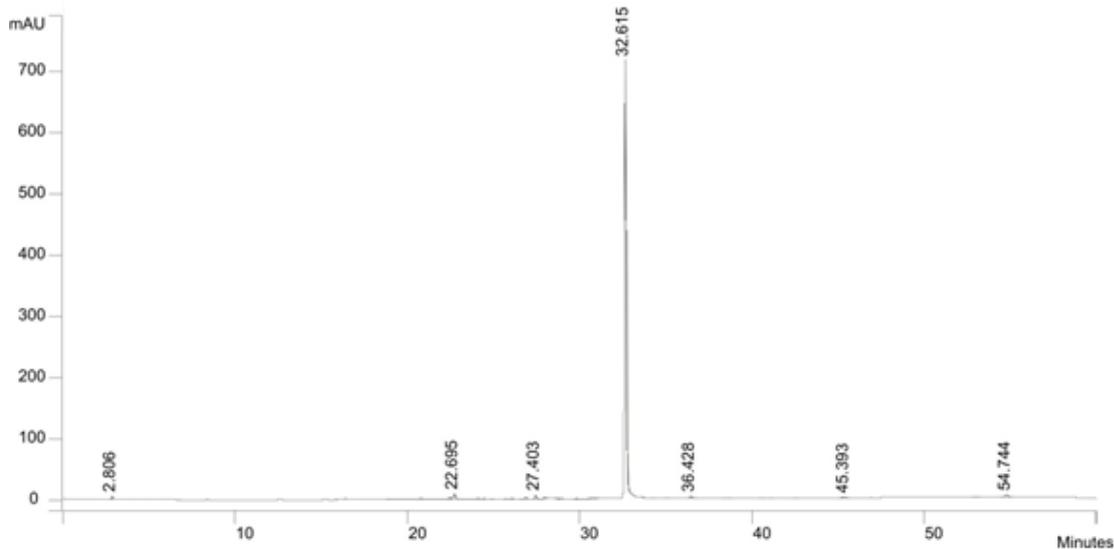
## 2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato bruto submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila dos fungos isolados nesse estudo e submetidos à CLAE-UV resultou em perfis de metabólitos distintos entre os isolados (anexos no final do capítulo). Porém os isolados MSC 267 (*P.variotti*) e MSC 61 (*A.flavus*) apresentaram um perfil cromatográfico mais puro (Figuras 4 e 5). Isolar todos os compostos químicos de todos os isolados se mostrou uma tarefa difícil para o trabalho e assim, os cromatogramas mais puros entre os isolados foram utilizados para selecionar os fungos candidatos para esse trabalho. No capítulo IV mostra que a toxicidade em *Artemia salina* também contribuiu para a seleção desses isolados.



**Figura 4** – Cromatograma dos compostos produzidos pelo isolado *A. flavus* (280nm).



**Figura 5** - Cromatograma dos compostos produzido pelo isolado *P. variotii* (280 nm).

## 2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE – EM/EM)

Os compostos produzidos por *A. flavus* e *P. variotii* foram submetidos a análises por CLAE-EM/EM e as massas encontradas foram em torno de 400 Da, o que corresponde a massas de metabólitos secundários de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Paecilomyces*. As figuras 1-10 apresentam os cromatogramas e os espectros de massas obtidos para esses compostos.

A relação do cromatograma de UV versus o cromatograma do EM não é quantitativo, uma vez que, uma banda intensa significa que molécula possui alta absorção na região do UV, e isto não é representativo de ser o composto majoritário na amostra, a concentração não está relacionada com a absorção. Compostos em baixa concentração, mas com grupos cromóforos que absorvem muito na região do UV possuem as bandas intensas na cromatografia.

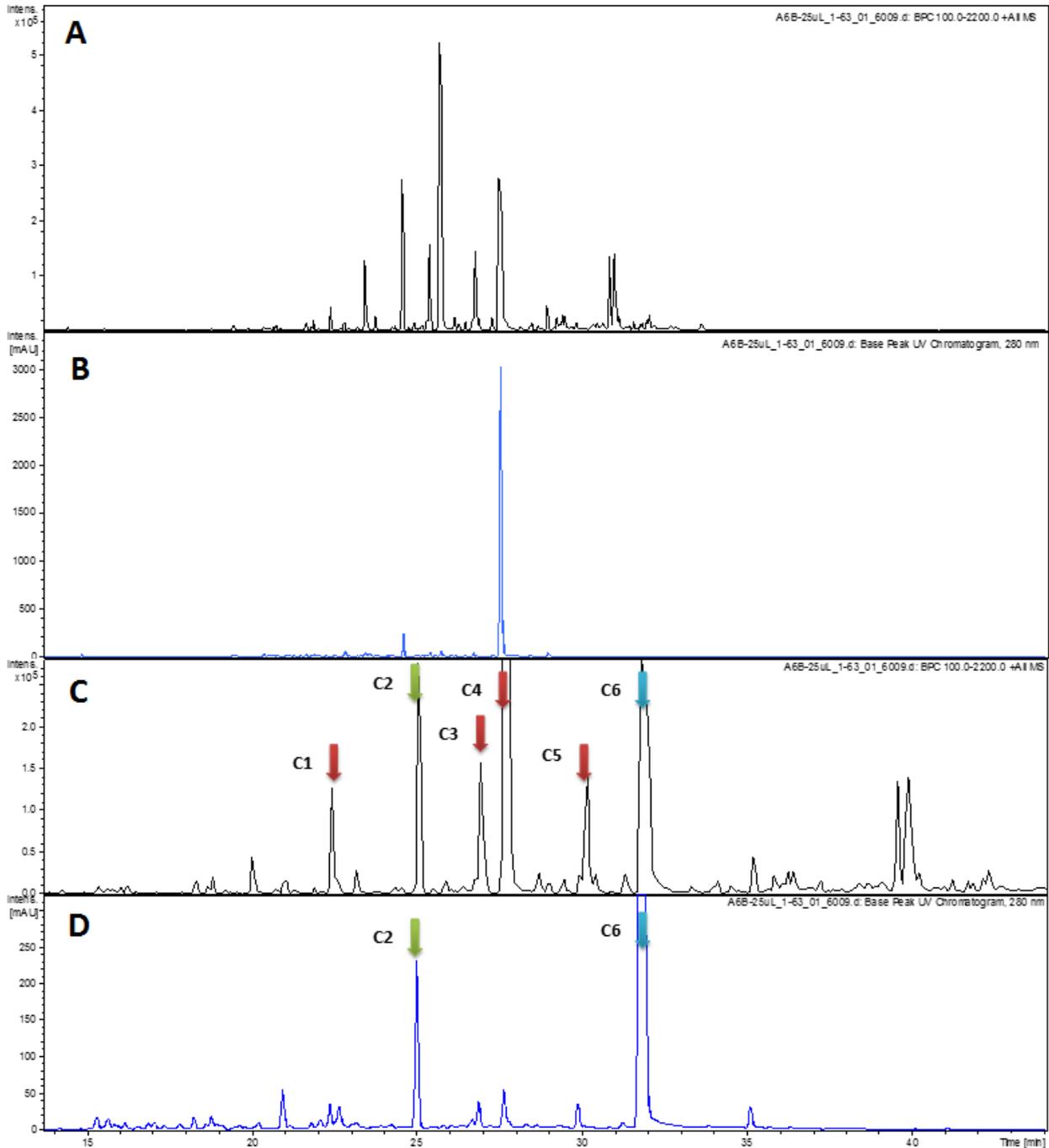
Da mesma forma, o cromatograma do espectro de massas é representativo dos analitos que apresentam a formação de um íon (no caso cátion, uma vez que a análise foi realizada em modo positivo). Ou seja, pode-se ter um composto identificado no UV, que não será identificado no espectro de massas, ou vice-versa.

As principais aflatoxinas produzidas pelos *Aspergillus* (B1, B2, G1 e G2) apresentam peso molecular que variam de 312 a 383 g.mol<sup>-1</sup> (RITTER, 2007; MIAO et al, 2012). Os

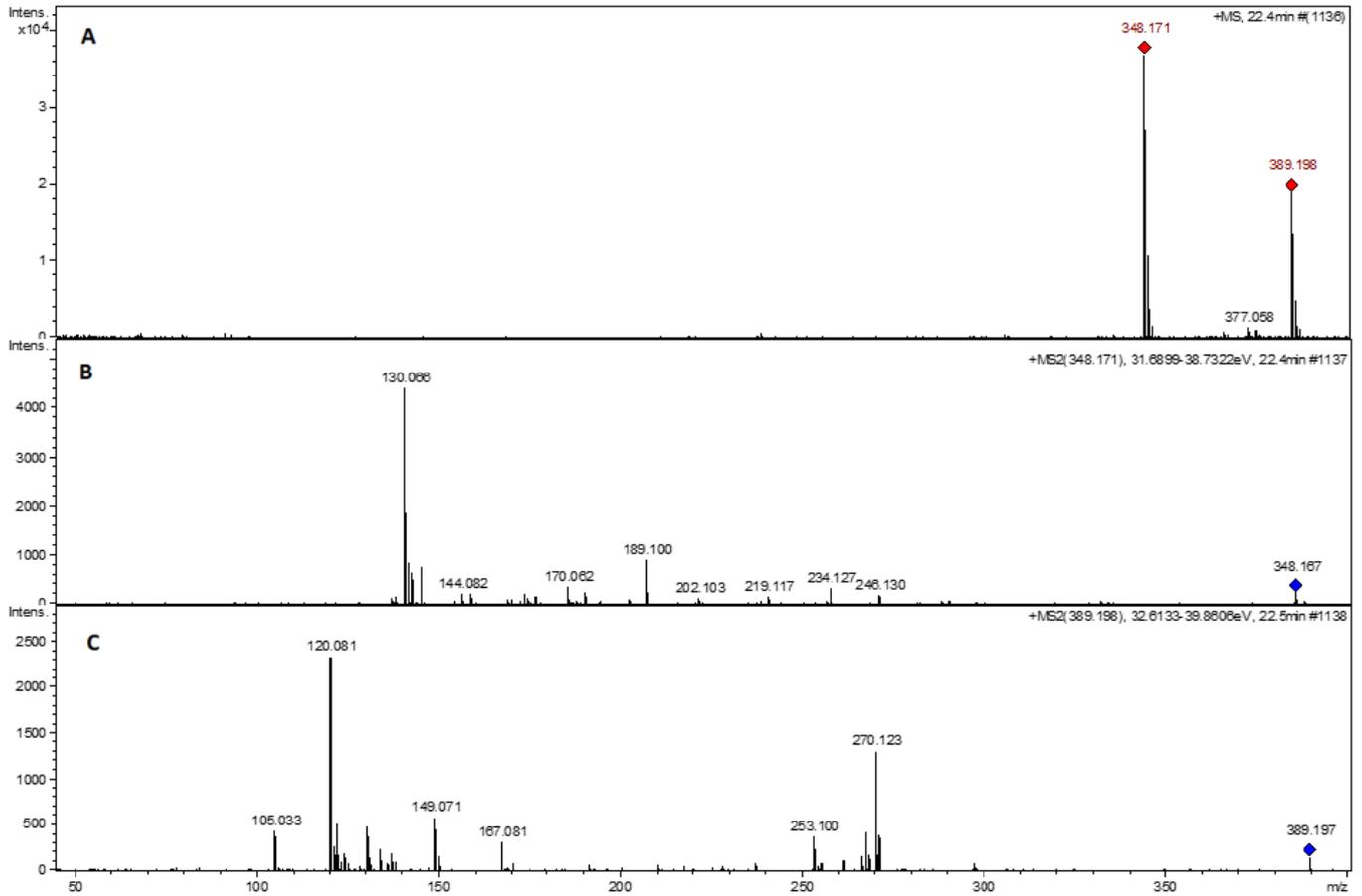
compostos isolados de culturas de *Aspergillus* deste trabalho possuem massas moleculares entorno de 336 -633 g.mol<sup>-1</sup> como mostram as figuras 6 a 12.

Para o gênero *Paecilomyces* observa-se compostos secundários com atividades biológicas potentes, tais como cornexistin, paecilocins, derivados de semiviriditoxin e ácido tricarbóxico, os quais possuem pesos moleculares entre 274 e 381 g.mol<sup>-1</sup> (LAI et al, 2015). Os espectros de massas obtidos para os compostos produzidos pelo *P. variotii* deste trabalho apresentam massas moleculares entre 375 a 388 g.mol<sup>-1</sup> (Figuras 13 e 14), as quais estão próximas das massas observadas na literatura.

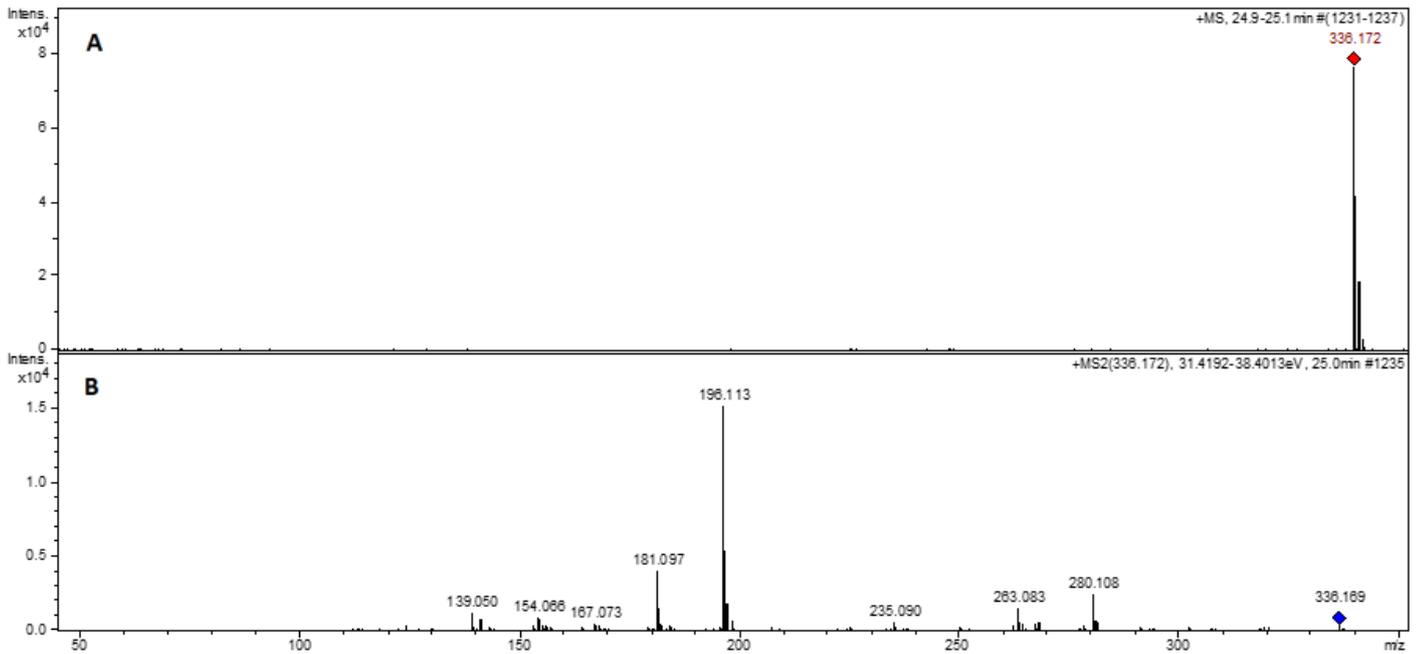
Estes metabólitos secundários serão explorados posteriormente, para final de caracterização e elucidação da estrutura destes compostos, haja vista o fato dos resultados encontrados nos testes de biosensaio realizados com estes metabólitos mostraram-se promissores, como demonstrado no capítulo IV.



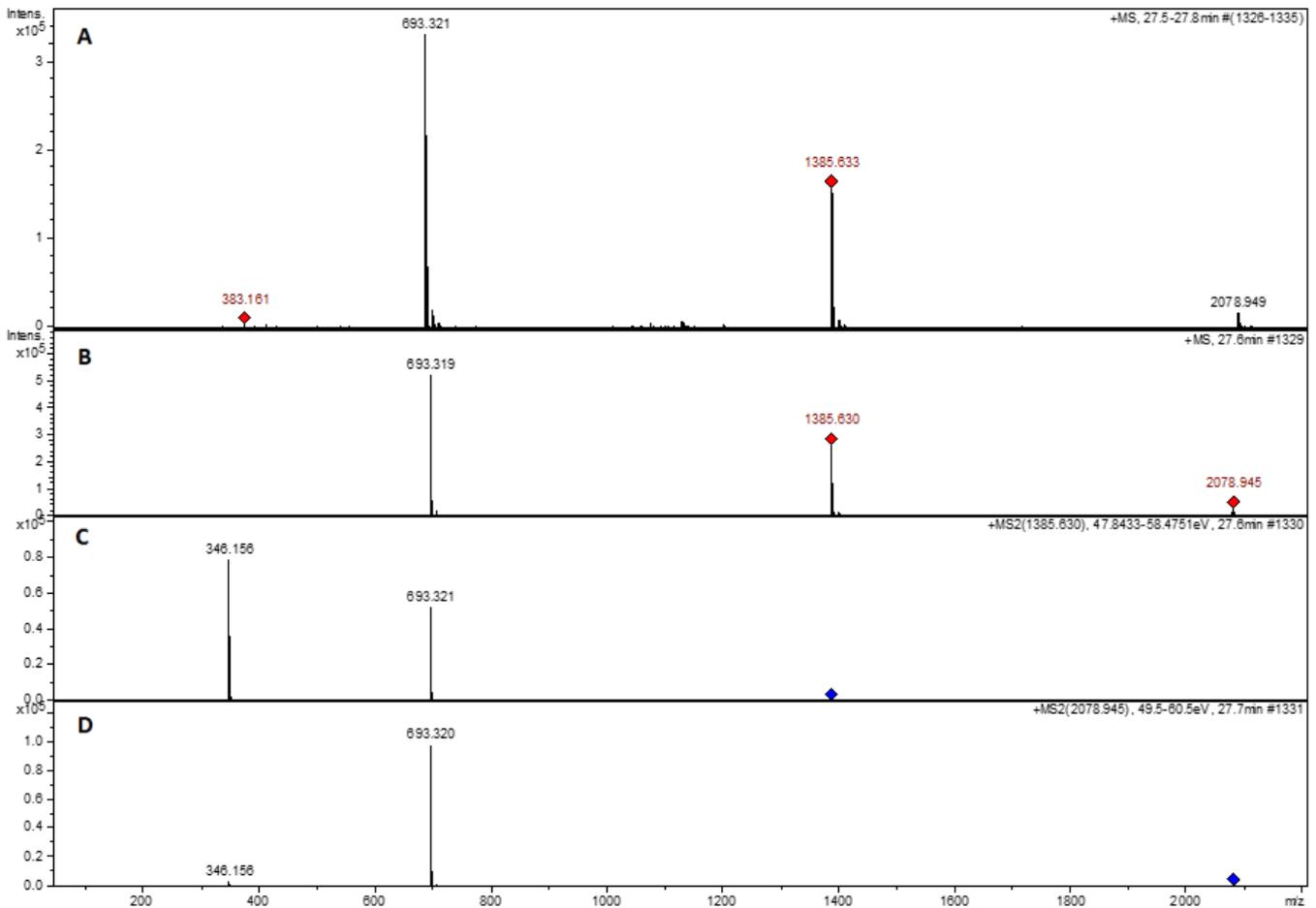
**Figura 6** - Cromatogramas dos compostos produzidos pelo fungo *A. flavus*. (A) - Cromatograma de íons totais (B) – Cromatograma em 280nm. (C e D) – Ampliação do Cromatograma ( A e B).



**Figura 7** - Espectro de massas para o composto C1 produzido pelo fungo *A. flavus*. (A) – Espectro de massas do composto C1 com tempo de retenção de 22,4 min. (B) e (C) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).

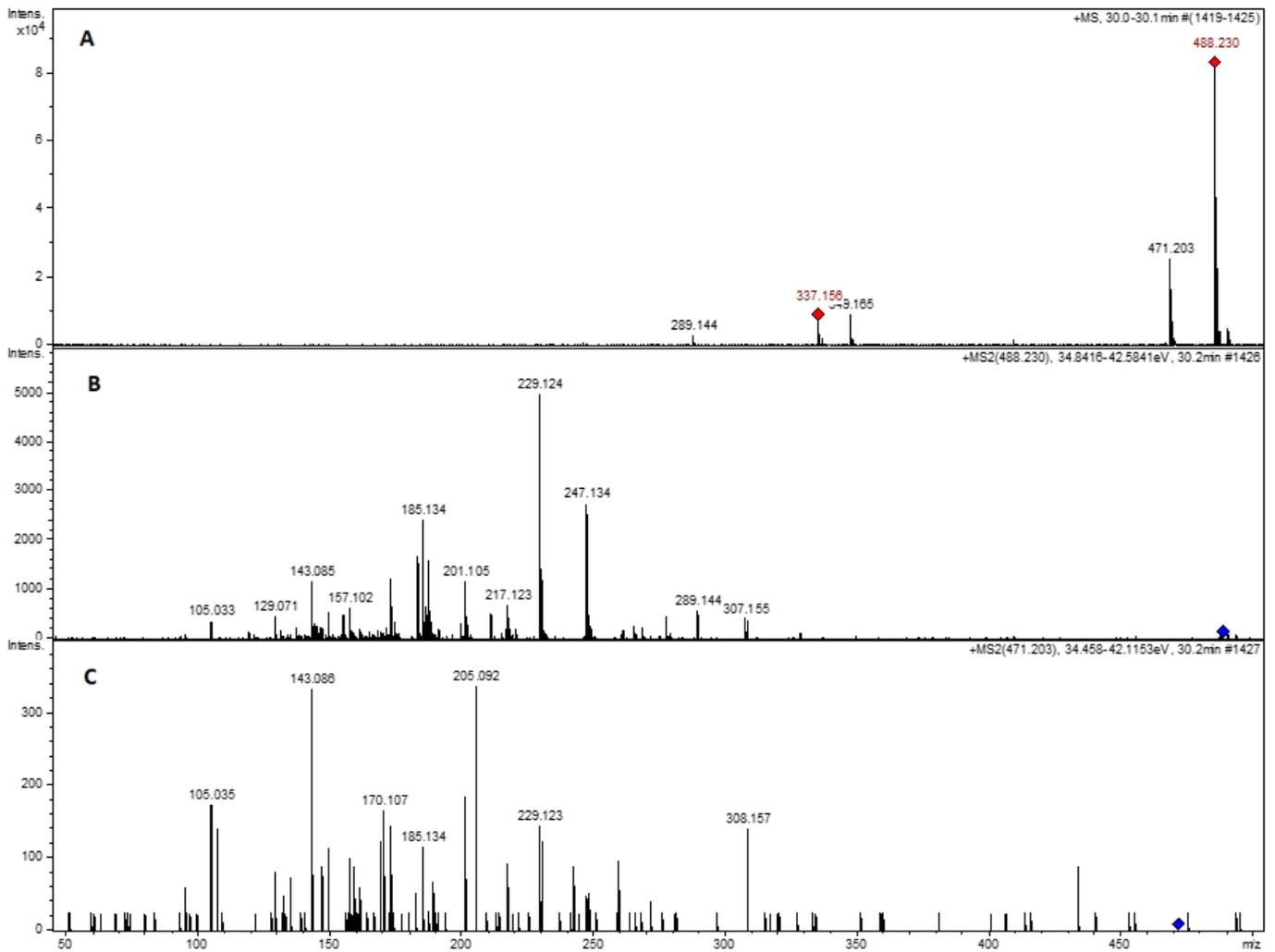


**Figura 8** - Espectro de massas do composto C2 produzido pelo fungo *A. flavus*. (A) – Espectro de massas do composto C2 com tempo de retenção de 25 min. (B) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).

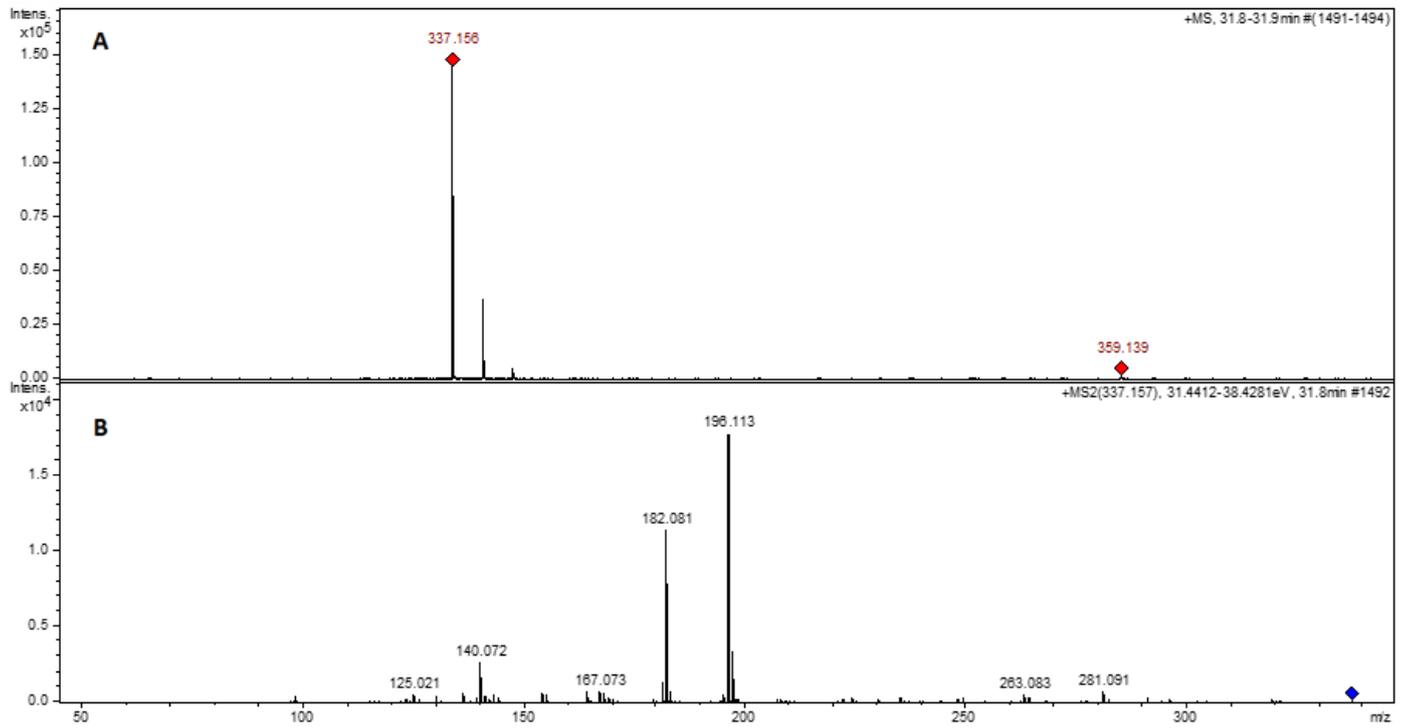


**Figura 9** - Espectro de massas do composto C3 produzido pelo fungo *A. flavus*. (A) – Espectro de massas do composto C3 com tempo de retenção de 26.9 min. (B), (C) e (D) – Espectro de massas do íon fragmentado do cromatograma (A).

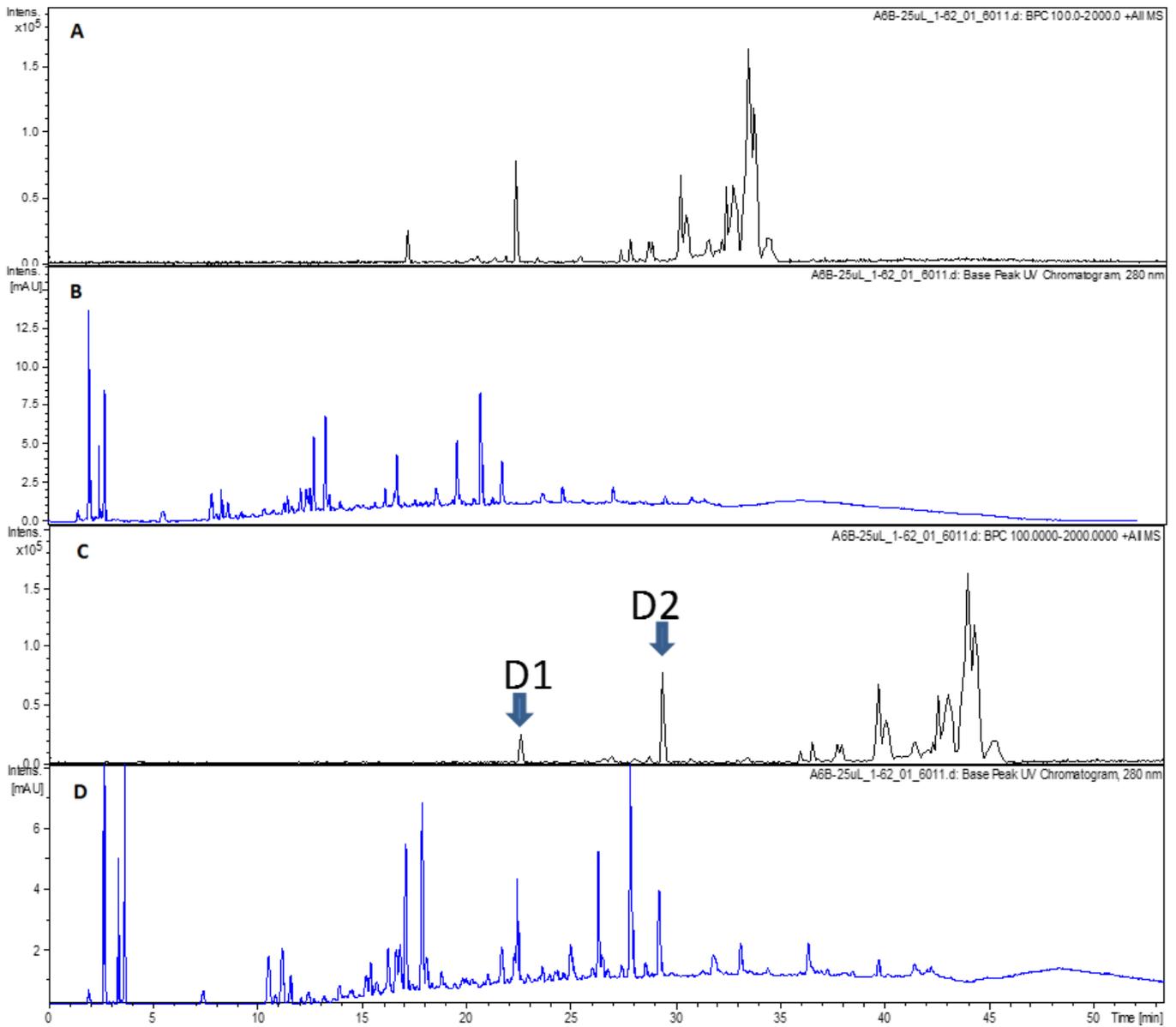
Vale ressaltar que a íon fragmentado de  $m/z$  693 representa duas vezes a massa do íon  $m/z$  346, o íon de  $m/z$  1385 representa 4 vezes o íon de  $m/z$  346, ou 2 vezes o íon de  $m/z$  693, enquanto que o de  $m/z$  2078 possivelmente é 6 vezes o íon de  $m/z$  346, ou 3 vezes o íon de  $m/z$  2079. Isso é um indicio de formação de aglomeradas durante a ionização, que dificulta a identificação do íon real.



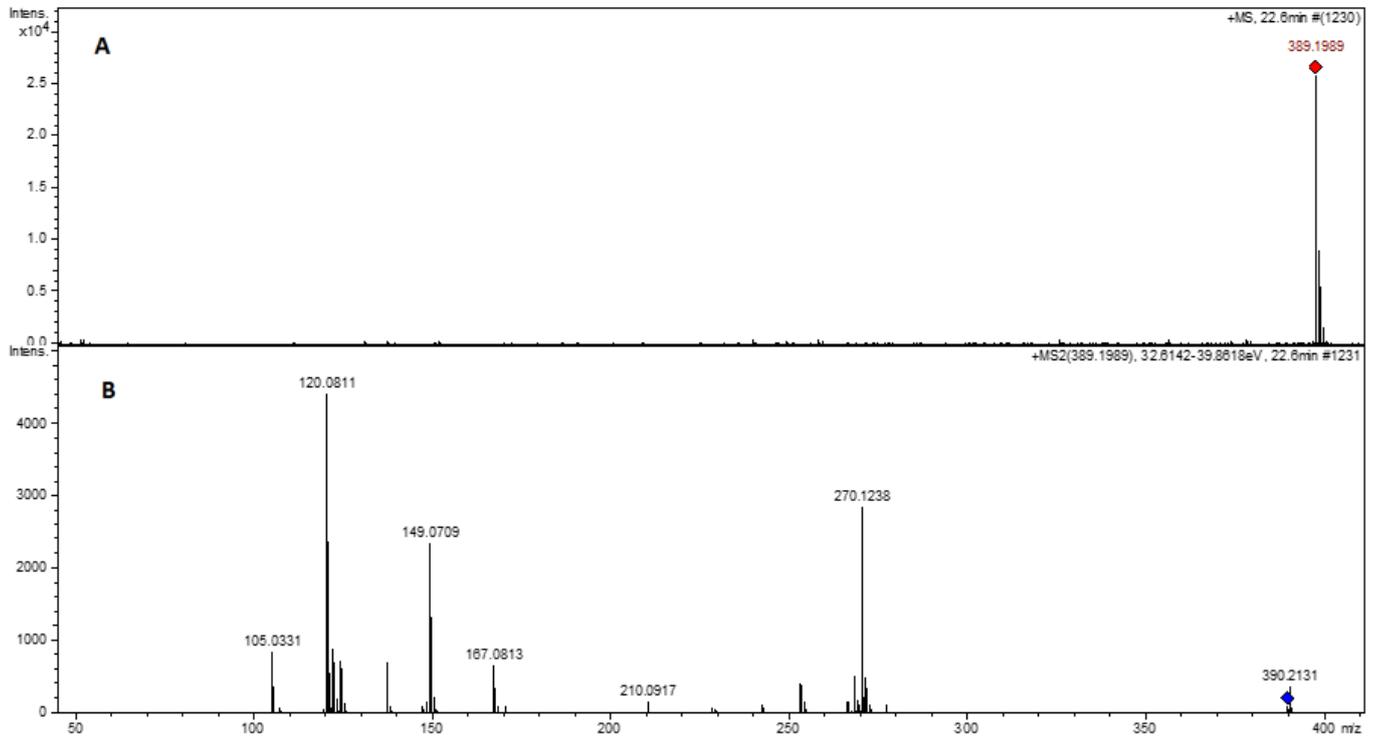
**Figura 10** - Espectro de massa do composto C4 produzido pelo fungo *A. flavus*. (A) – Espectro de massas do composto C4 com tempo de retenção em 30.1 min. (B) e (C) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).



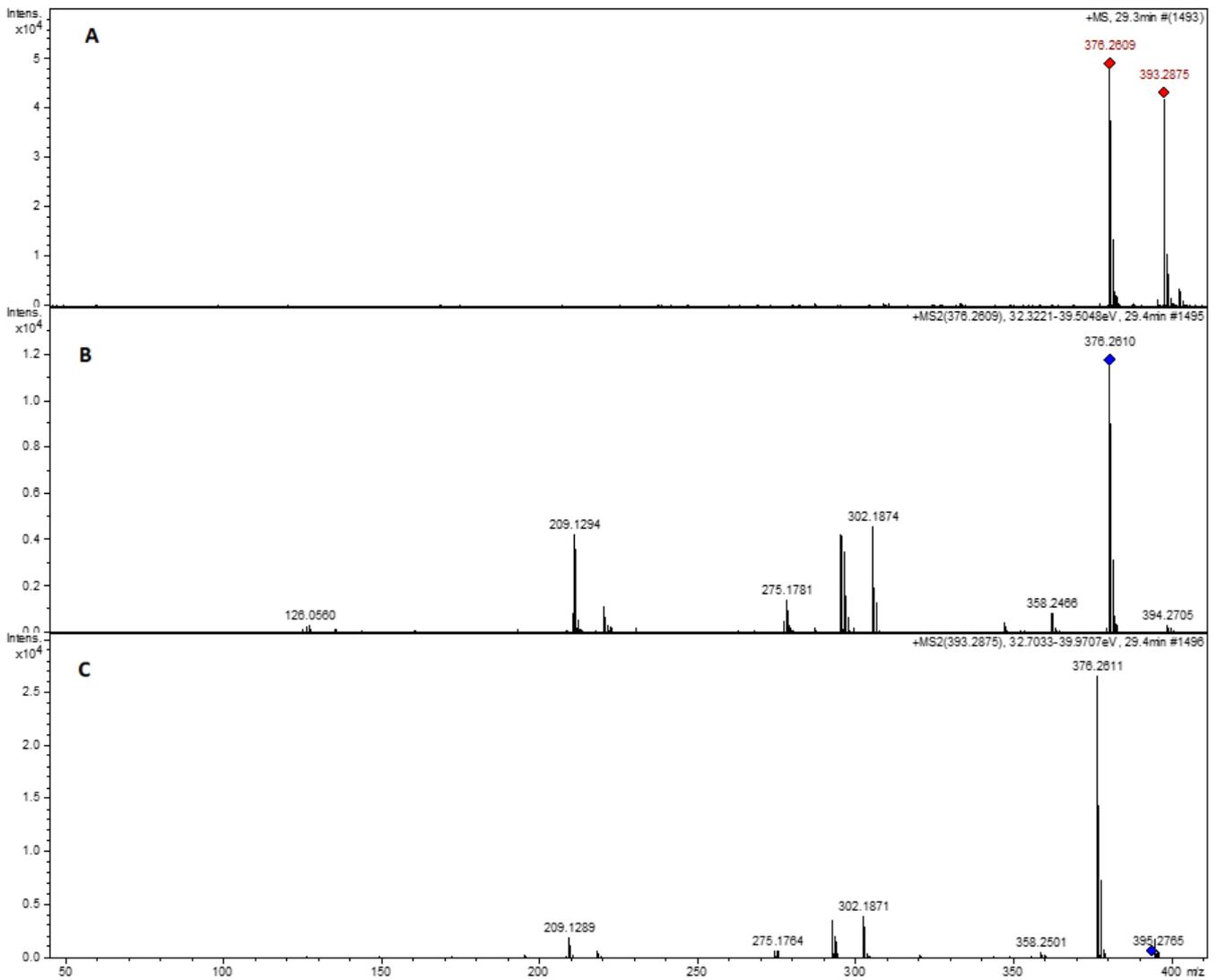
**Figura 11** - Espectro de massa do composto C5 produzido pelo fungo *A. flavus*. (A) – Espectro de massas do composto C5 com tempo de retenção em 30.1 min. (B) e (C) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).



**Figura 12-** Cromatogramas dos compostos produzidos pelo fungo *P. variotii*. (A) - Cromatograma de íons totais (B) - Cromatograma em 280nm. (C e D) - Ampliação do Cromatograma (A e B).



**Figura 13** - Espectro de massa do composto D1 produzido pelo fungo *P. variotii*. (A) – Espectro de massas do composto D1 com tempo de retenção de 22.6 min. (B) – Espectro de massas dos íons fragmentos do cromatograma (A).



**Figura 14** - Espectro de massa do composto D2 produzido pelo fungo *P. variotii*. (A) – Espectro de massas do composto D2 com tempo de retenção de 29.3 min. (B) e (C) – Espectro de massas do íons fragmentos do cromatograma (A).

## CAPÍTULO IV

*Este capítulo apresenta as análises de avaliação do potencial biológico dos compostos produzidos por *A. flavus* e *P. variotii* pela avaliação de toxicidade em *Artemia salina*, avaliação da susceptibilidade a antimicrobiano por disco-difusão e diluição, avaliação da concentração mínima inibitória e avaliação citotóxica pelo método de MTT.*

## 1. METODOLOGIA

### 1.1. Teste de Letalidade em *Artemia salina*

O bioensaio com *Artemia salina* foi realizado em microplaca de poliestireno de 96 poços com as seguintes concentrações: 2400, 1200, 300, 75 e 18,75 µg/mL dos compostos extraídos. Os ensaios foram realizados segundo metodologia adaptada de Rehman et al. (2005). Para a eclosão dos cistos, foi empregado o meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho em água destilada 4,0% (p/v) suplementado com extrato de leveduras (6g.L<sup>-1</sup>) e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Os cistos foram incubados por 36 horas no meio com iluminação natural, com temperatura ambiente e oxigenação constante. Após a eclosão, os náuplios foram transferidos para uma placa de Petri e, com auxílio de uma micropipeta, foram distribuídas dez larvas para cada poço da microplaca na presença das concentrações dos compostos a serem testados. Após 24 horas de incubação, foi realizada a contagem de artemias vivas e mortas ou imobilizadas. Foram incluídos nos ensaios controles positivos e de letalidade utilizando diluições seriadas de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e controle negativos, somente com água salina. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A toxicidade foi expressa como concentração letal a 50% (CL<sub>50</sub>) estimada a partir do método da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e concentração da substância teste, usando o programa *Statplus 2009 professional (AnalystSoft/Probitos)*.

Para a classificação do nível de toxicidade, foi utilizado o critério proposto por Nguta et al. (2012). O autor considera toxicidade alta para valores de CL<sub>50</sub> até 100 µg.mL<sup>-1</sup>, toxicidade moderada para CL<sub>50</sub> entre 100 e 500 µg.mL<sup>-1</sup>, e valores entre 500 e 1000µg.mL<sup>-1</sup> apresentam baixa toxicidade, e os não tóxicos estão acima de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>.

### 1.2. Susceptibilidade a Antimicrobiano por Disco-Difusão

Para os testes de disco-difusão foi utilizada uma suspensão a 0,5 de McFarland, que alcança uma concentração de aproximadamente de 1 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Esta solução foi semeada em ágar LB e, em seguida, discos de papel de filtro estéreis (6 mm) impregnados com 10µL de uma solução dos compostos extraídos, com Acetato de Etila 2,5%, nas respectivas concentrações (2400, 1200, 300, 75 e 18,75 µg.mL<sup>-1</sup>), foram colocados sobre a

superfície do ágar inoculado. Após incubação por  $\pm 24$  horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , procurou-se a formação de halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco. Os solventes bem como os diluentes utilizados na dissolução do filtrado foram usados como controle negativo.

### 1.3. Susceptibilidade a Antimicrobiano por Diluição

Para a realização de diluição em caldo foi necessária uma diluição de 1:15 a partir da suspensão inicial das cepas das bactérias testadas (*Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina - MRSA) para atingir 0,5 de Mac Farland, em caldo LB ajustado para obtenção de uma concentração de  $1 \times 10^8 \text{UFC.mL}^{-1}$ .

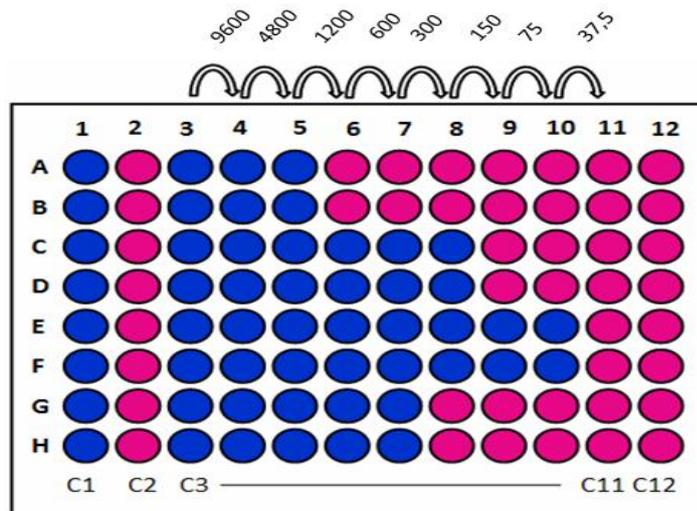
Para cada microrganismo foi preparado uma concentração de compostos referentes a  $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em tubos de ensaio de 20 mL com tampa. O ensaio foi realizado da seguinte forma: Cada um dos tubos continha uma das concentrações dos extratos de compostos de cada um dos fungos ( $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 3,0 mL de caldo LB e 30  $\mu\text{L}$  da solução de bactérias na escala de 0,5 Mc Farland. Um tubo continha apenas caldo LB (3,0 mL) denominado controle, outro tubo continha 3,0 mL de caldo LB, (125  $\mu\text{L}$  de água e 875  $\mu\text{L}$  de Acetato de Etila) denominado branco e por último um tubo contendo antibióticos (100 $\mu\text{L}$  de Cloranfenicol [ $100\text{mg.mL}^{-1}$ ] para *E. coli* / 100 $\mu\text{L}$  de Oxacilina [ $100\text{mg.mL}^{-1}$ ] para *S. aureus* e 3,0mL de caldo LB). Os tubos foram incubados por 24 horas no agitador mecânico a 150 rpm a  $30^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação, realizou-se uma diluição seriada das amostras para alcançar as concentrações de  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ . Adicionou-se em cada placa uma quantidade de 50 $\mu\text{L}$  de cada solução em ágar LB semeada com auxílio da alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 24 horas. Posterior a esse intervalo, foi verificado o crescimento de  $\text{UFC.50}\mu\text{L}^{-1}$  e seguiu-se com a contagem das colônias.

### 1.4. Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizada através da técnica de microdiluição, em multiplacas com 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), usando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) como indicador de viabilidade bacteriana.

Foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura líquido LB (para *S. aureus*; MRSA e *E. coli*) nos poços das placas, exceto os poços da coluna 2 que receberam 50  $\mu\text{L}$  do meio de

cultura e 50  $\mu\text{L}$  do veículo de diluição da amostra (controle do agente de solubilização). Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra nos poços da coluna 3 e realizado o processo de microdiluição seriada, da linha A coluna 3 para coluna 4 e assim sucessivamente até a coluna 11, obtendo-se concentrações decrescentes que variaram de 9600 a 37,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Após a diluição das amostras, foi adicionado aos poços 10  $\mu\text{L}$  dos inóculos microbianos padronizados, exceto nos poços da coluna 1 (controle de esterilidade do meio). A coluna 12 (controle positivo do inóculo) só recebeu 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 10  $\mu\text{L}$  do inóculo (Figura 15).



**Figura 15** – Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos pela técnica de micro diluição

As microplacas foram cultivadas a 37 °C por 24 horas para bactérias. Para comparar a atividade antibacteriana utilizou-se como padrão a oxacilina para *S. aureus* e cloranfenicol para *E. coli*.

Após o período de cultivo, as microplacas foram reveladas com 30  $\mu\text{L}$  de resazurina a 0,01% e incubadas por 1 hora para que ocorresse a mudança de coloração nos poços. A resazurina é um corante azul indicador de óxido-redução, em que a manutenção da cor azul nos poços é interpretada como inibição de crescimento, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, ocorrência de crescimento. A CMI foi definida como a menor concentração dos metabólitos secundários que inibiram o crescimento dos microrganismos. Cada amostra foi testada em triplicata em três experimentos independentes.

## 1. 5. Avaliação da atividade citotóxica

Os compostos produzidos por *P.variotti* e *A. flavus* foram submetidos ao bioensaio de citotoxicidade frente às linhagens tumorais WM1366 e A375. As amostras foram solubilizadas em DMSO/meio RPMI (1:100) sendo este diluente utilizado como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o DMSO e  $As_2O_3$ . Para avaliar a atividade citotóxica foi utilizado o método colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) segundo Mosmann, 1983. A avaliação da atividade citotóxica foi determinada por espectrofotometria, utilizando filtro de interferência de 540 nm.

### 1.5.1. Ensaio de atividade mitocondrial

As células de linhagem WM1366 e A375 ( $5 \times 10^5$ /mL), e as células mononucleares humanas ( $1,5 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas na presença dos compostos extraídos do fungo *P.variotti* e *A.flavus* (6 – 48 $\mu$ g/mL) em placas de 96 poços. Como controle positivo de indução de morte celular foi utilizado  $As_2O_3$  (1,5  $\mu$ M) e controle negativo o DMSO (2% do volume de cultivo celular). Após o período de incubação de 24 h, a atividade enzimática foi determinada através da redução enzimática de 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em cristais de formazan (Mosmann, 1983). A solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada aos poços de forma que o concentração final de MTT reduzisse para 500  $\mu$ g/mL, com posterior incubação a 37°C com 5%  $CO_2$  por 3 horas e meia. Em seguida, as placas foram centrifugadas (300g, 10 minutos a RT) e o sobrenadante foi removido, seguido pela adição de 100 $\mu$ L de DMSO por poço. Após incubação overnight em temperatura ambiente, a absorbância em 570 nm foi mensurada usando um espectrofotômetro (Power Wave<sub>x</sub> Biotek Instruments Inc.). A atividade mitocondrial foi expressa em porcentagem e calculada da seguinte forma:  $((OD \text{ do poço com estímulo} / \text{valor médio da OD dos poços não estimulados}) - 1) \times 100\%$ . Atividade mitocondrial representa o aumento ou diminuição em relação às células não estimuladas, expresso em porcentagem.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 2.1. Avaliação de Toxicidade por *Artemia salina*

Nos estudos de triagem de novas moléculas bioativas os testes toxicológicos assumem grande importância na triagem de uma ampla gama de compostos a fim de se avaliar ou prever a toxicidade relativa destas substâncias nos sistemas biológicos.

Várias técnicas são utilizadas para a verificação da toxicidade de substâncias, com a utilização de organismos em laboratório, tais como microrganismos, cobaias e até mesmo seres humanos. Uma tendência natural das últimas décadas é a substituição do uso de animais de laboratório em testes toxicológicos, devido ao alto custo e ao sofrimento causado a esses animais. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos levou à busca de novos testes (CAVALCANETE et al., 2000).

Esses métodos alternativos incluem testes de toxicidade que utilizam a *Artemia salina*. O ensaio para a determinação de toxicidade aguda frente ao microcrustáceo constitui-se num método seguro, rápido, prático e de baixo custo (PISUTTHANAN et al., 2004; LUNA et al., 2005).

O bioensaio com *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade de compostos sintéticos e produtos naturais (AMARANTE et al., 2011). A *Artemia salina* é um microcrustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em águas salgadas e salinas de todo o mundo (SORGELOS et al., 1986; NASCIMENTO et al., 2008). A utilização desta espécie apresenta a vantagem de seus cistos serem metabolicamente inativos e resistirem à secagem e estocagem por longos períodos de tempos e mantidos desidratados, de preferência em vácuo e em baixas temperaturas (GOMES, 1986).

Os metabólitos secundários dos fungos (Tabela 2) foram testados nas concentrações de 2400, 1200, 300, 75 e 18,75  $\mu\text{m}.\text{mL}^{-1}$ . A análise dos ensaios testados confere para o dicromato de potássio toxicidade alta ( $\text{CL}_{50} = 11,49 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), dentro dos padrões apresentados pela literatura atesta a adequação das condições experimentais (MOLINAS-SALINAS, SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

**Tabela 2** – Toxicidade dos metabólitos secundários dos fungos expressa como concentração letal para 50% (CL<sub>50</sub>) das larvas de *Artemia salina*

Fungos	CL <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Classificação da toxicidade (Nguta et al., 2012)
MSC 89	725,1	Baixa
MSC 28	836	Baixa
MSC 267	163	Moderada
MSC 48	138	Moderada
MSC 61	81	Alta
MSC 62	685	Baixa
MSC 78	947	Baixa
MSC 306	67	Alta
MSC 402	684	Baixa
MSC 77	715	Baixa
MSC 95	329	Moderada

Dentre os 11 fungos inicialmente isolados, 05 apresentaram uma Concentração Letal 50 (CL<sub>50</sub>) entre moderada e alta, de acordo com a classificação de Nguta et al.(2012).

Neste ensaio o extrato de compostos do isolado do *A. flavus* (MSC 267) apresentou CL<sub>50</sub> equivalente a 81 µg.mL<sup>-1</sup>. Resultado este considerado de alta toxicidade frente ao parâmetro adotado. Entretanto, Miao e colaboradores (2012) demonstraram que o composto isolado de *Aspergillus versicolor*, 6-*O*-metilaverufim apresentou uma CL<sub>50</sub> de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup>. As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A.flavus* e *A.parasiticus*. São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, que podem estar envolvidas com o potencial antimicrobiano atribuído ao extrato estudo (DAVIS; DIENER; ELDRIDGE, 1996; OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Segundo Asaff e colaboradores (2006) em teste com *Artemia salina*, os compostos isolados de fungos do gênero *Paecilomyces* exibem CL<sub>50</sub> iguais a 44,5 µg.mL<sup>-1</sup>. Valor este inferior ao encontrado pelo extrato do isolado *Paecilomyces variotii* com toxicidade moderada (CL<sub>50</sub> = 163 µg.mL<sup>-1</sup>). O gênero *Paecilomyces* já vem sendo utilizado como fonte de bioinseticidas no manejo de praga, devido seu potencial toxicológico. Potencial que pode ser atribuído ao ácido dipicolínico, isolado de metabólitos secundários dos fungos do gênero

*Paecilomyces* (ASAFF; CERDA- GARCIA-ROJAS; TORRE, 2005). Outras toxinas do fungo também podem contribuir para a ação letal, tais como o ácido oxálico, a beauvericina e a beauveralides (ASAFF, 2006; LOGRIECO et al., 1998).

## 2.2. Teste de Susceptibilidade a Antimicrobiano

Inicialmente, foram utilizados dois métodos de antibiograma: inibição por método de disco-difusão e inibição por diluição em caldo. Nos dois testes, a atividade antibacteriana dos compostos isolados nas concentrações de 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 160  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi testada contra bactérias padrão ATCC (*S. aureus* e *E. coli*) e MRSA. Apenas no teste de diluição foi avaliada a atividade dos compostos em relação a cepas padrão e cepa multirresistente. Nos ensaios de disco-difusão, para avaliação da zona de inibição de crescimento bacteriano, não foi evidenciada atividade em nenhuma das cepas testadas. Em todos os ensaios não houve formação de halos de inibição de crescimento na superfície das placas de ágar LB.

A técnica de disco-difusão não se mostrou eficaz, pois em nenhum dos ensaios realizados foi observado halo de inibição do crescimento bacteriano. Tal fato possivelmente ocorreu em função do caráter hidrofóbico dos compostos, visto que eles eluem em uma porcentagem de 75% de acetonitrila na CLAE. A hidrofobicidade é uma característica comum dos compostos extraídos com acetato de etila (MENDES et al., 2004; MENDES et al., 2005). Isso pode ter favorecido sua adesão ao papel de filtro utilizado como ponto inicial de difusão no ágar LB, e dificultado a difusão no meio sólido, mesmo estando dissolvido em 2.5 % de acetato de etila. Em contrapartida, nos ensaios realizados pela técnica de diluição em caldo LB houve inibição do crescimento tanto das cepas padrão, quanto da multirresistente testada (MRSA). Resultados semelhantes foram descritos por Castro (2013).

Apesar de não apresentar halos de inibição na concentração de até 160  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pela técnica de disco-difusão, estudos realizados por Silva et al. (2011) inferiram sensibilidade para *S. aureus* na concentração de 1200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Neste trabalho, em ensaios de susceptibilidade, utilizando a mesma técnica, foi possível observar a formação de halos de sensibilidade de 14,25 mm para compostos extraídos do *Aspergillus niger* e 21,0 mm para *P. variotii*.

Contudo, estirpes de *Echerichia coli* se demonstraram resistentes mesmo na concentração de 1200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho. Outro trabalho correlacionado foi realizado por Miao (2012), no qual foram isolados 11 compostos de culturas de *Aspergillus versicolor*, dos quais 3 mostraram atividade

antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *S. aureus*. Nos testes de difusão em ágar utilizando 30 µg dos compostos isolados no disco, os halos de inibição variaram entre 10 e 11 mm para as bactérias testadas.

Em contrapartida, nos ensaios por diluição em caldo, os compostos apresentaram atividade contra as três bactérias testadas.

A ação dos compostos extraídos no estudo sobre o crescimento das cepas pode ser visualizada na tabela 4. O efeito dos compostos isolados foi mais significativo contra cepas de *Staphylococcus aureus*, com uma MIC100 abaixo de 40 µg.mL<sup>-1</sup> dos compostos do fungo *P. variotii* e para os compostos isolados do MSC 61 (*A. flavus*) a MIC 50 está entre a concentração de 40 a 80 µg.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 3** - Susceptibilidade dos compostos dos fungos *A. flavus* e *P. variotii* contras a cepa de *E. coli*, *S. aureus* e MRSA.

		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	MRSA
	[µg.mL <sup>-1</sup> ]	UFC/50µL	UFC/50µL	UFC/50µL
<i>P. variotii</i>	40	-	207	120
	80	-	-	6
	160	-	-	2
<i>A. Flavus</i>	40	88	24	6
	80	5	-	2
	160	-	-	-
<b>Controle positivo</b>		87	234	142

Contra as cepas de *Escherichia coli* seriam necessárias concentrações superiores a 40 µg.mL<sup>-1</sup> e inferiores a 80 µg.mL<sup>-1</sup> para se calcular a CMI, pois nesse estudo não foi possível calcular com maior precisão a MIC50 ou MIC100.

O desempenho dos compostos provenientes do MSC 267 para inibir 100% do MRSA viável foi abaixo de 160 µg.mL<sup>-1</sup>. O extrato bruto de compostos do isolado MSC 61 também foi eficaz frente cepa MRSA, mostrando um MIC 50 entre as concentrações de 40 µg.mL<sup>-1</sup> a 80 µg.mL<sup>-1</sup>

### 2.3. Concentração Mínima Inibitória – CMI

A concentração Mínima Inibitória foi um parâmetro observado por meio do emprego indicador colorimétrico de crescimento celular, resazurina. A utilização deste método permitiu verificar o valor da concentração mais baixa das substâncias testadas que impede o crescimento visível dos microrganismos analisados neste estudo após o tempo de incubação de 24 horas.

Nos testes de sensibilidade de antimicrobianos a CMI é considerada o “padrão ouro” para determinar a susceptibilidade de microrganismos (ANDREWS, 2001). A resazurina é um corante também conhecido como azul Alamar que é utilizado pela indústria, pesquisa e laboratórios clínicos para verificar o estado metabólico de células humanas e animais cultivadas, bactérias e fungos. Uma vez que o ensaio é simples, não tóxico e preciso, é usado extensivamente em laboratórios em todo o mundo.

Os resultados da CMI para os compostos testados frente aos microrganismos estão apresentados nas tabelas de 2 a 4. A atividade metabólica foi determinada pelo coeficiente da extinção molar da resazurina, dada pela seguinte fórmula:

$$\frac{(PT_{492nm} - (PT_{630nm} \times FC_{630nm}))}{(CP_{492nm} - (CP_{630nm} \times FC_{630nm}))} \times 100$$

Onde,

**PT** = DO dos Poços-Teste,

**FC** = DO do Fator de Correção

**CP** = DO dos controles positivos.

O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (de cor azul) e resofurina (de cor rósea) por metabolização celular (PALOMO et al., 2002; ROZZATO, 2012).

**Tabela 4** - Resultados da Viabilidade celular das bactéria *E. coli*, *S. aureus* e MRSA frente aos compostos extraídos dos fungos *P. variotii* e *A. flavus*

		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA
	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Viabilidade (%)		
<i>P. variotii</i>	9600	24,11	6,74	29,62
	4800	31,2	14,33	26,11
	2400	32,93	25,61	27,59
	1200	54,82	48,43	41,05
	600	56,83	50,86	48,18
	300	68	53,53	69,3
	150	76,91	54,04	80,77
	75	77,7	56,54	87,49
	37,5	79,02	58,43	90,84
<i>A. flavus</i>	9600	12,89	6,47	61,75
	4800	23,95	8,04	67,32
	2400	30,63	19,72	72,58
	1200	34,38	31,68	74,09
	600	55,96	49,8	85,54
	300	57,4	50,06	87,13
	150	74,6	51,67	89,02
	75	76,3	53,99	92,01
	37,5	78,8	54,94	98,84
Viabilidade do Controle Positivo:		98,75%	96,15%	97,86%

Os compostos isolados do *P. variotii* propiciou redução do metabolismo celular em torno de 50% para a bactéria *Escherichia coli* entre as concentrações de 1200 a 2400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , mas a viabilidade celular foi afetada em maior grau pelo fungo *A. flavus*, uma vez que na concentração de 9600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a redução foi em torno de 12%.

A viabilidade celular para *Staphylococcus aureus* foi afetada em proporções semelhantes para os dois compostos isolados, o que demonstra uma maior sensibilidade dessa bactéria frente aos compostos.

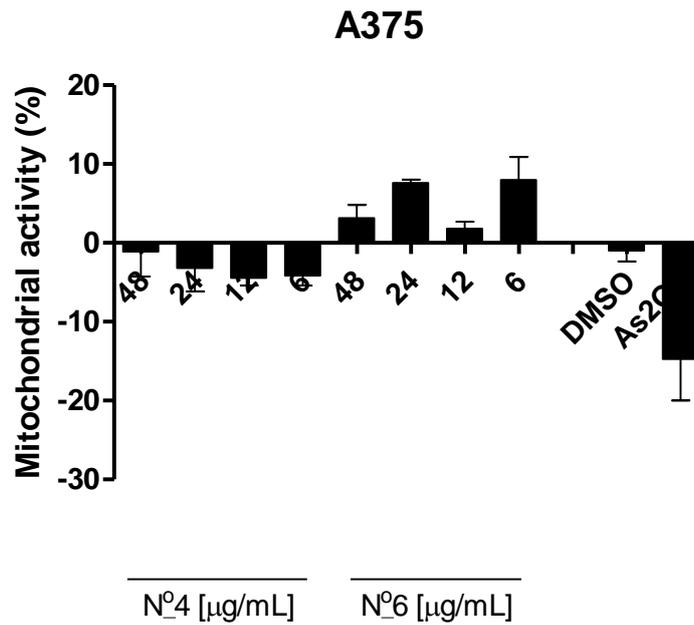
Já para a bactéria multirresistente (MRSA) nota-se maior diferença na viabilidade celular pela ação dos compostos extraídos, ao confrontar os resultados do isolado *A. flavus* que não apresentou inferência no metabolismo bacteriano tão significativo, pois na

concentração de 9600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi afetado apenas 61,75% contra 29,62% dos compostos provenientes do fungo *P. variotii*.

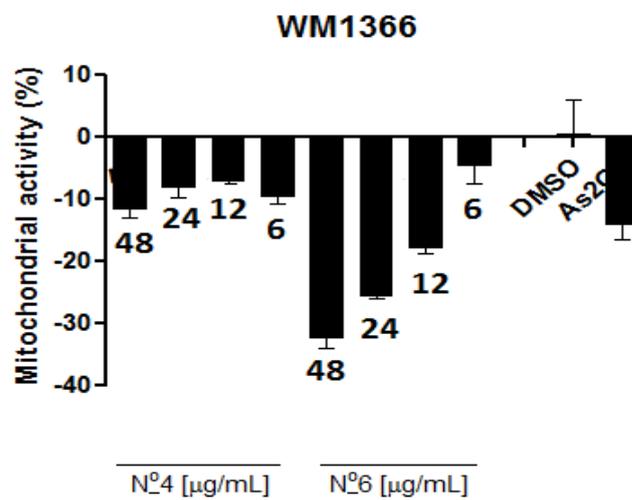
Em trabalho anterior, realizado por Guimarães et al. (2009), utilizando fungos endofíticos e resazurina foi realizado teste de concentração mínima inibitória contra bactérias patogênicas (*E.coli* e *S. aureus*). Tais testes foram realizados com extratos obtidos a partir de culturas de *Paecilomyces clavisporus* e outros fungos. Sendo possível observar uma viabilidade celular menor que 30% de metabolização de resazurina para *E. coli* na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato do fungo. Valor este que pode ser encontrado em concentrações acima de 2400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para *A. flavus*, e acima de 9600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para *P. variotii*. Em cepas de *S. aureus* Guimarães et al. (2009) não encontraram inibição significativa. Entretanto, neste presente estudo uma inibição foi observada para ambos os extratos nas concentrações de 2400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já para as cepas resistentes de *S. aureus* (MRSA) uma inibição foi inferida somente para a espécie de *P. variotii* nas concentrações acima de 2400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### **2.4. Avaliação citotóxica pelo método de MTT**

Com o intuito de investigar o efeito biológico dos compostos isolados por *A. flavus* e *P. variotii*, consideramos as células mononucleares de sangue periférico como fator inicial na determinação da atividade citotóxica dos peptídeos em células humanas de indivíduos saudáveis. Ambos os estímulos apresentaram efeito citotóxico em PBMC na concentração acima de 48  $\mu\text{g/mL}$ , fato evidenciado pela atividade mitocondrial mensurada pelo ensaio de MTT. Em vista dessa atividade citotóxica dos compostos, avaliamos o comportamento dos compostos isolados sobre células de melanoma, especificamente nas linhagens WM1366 e A375, adotando como teste as concentrações dos peptídeos abaixo de 48  $\mu\text{g/mL}$ . Para isso, a atividade mitocondrial das células de linhagem WM1366 e A375 foi determinada através do ensaio de MTT, e ambos os compostos promoveram efeito citotóxico nas células WM1366 e A375 de maneira dose-dependente (Figuras 16 e 17). Como controle negativo consideramos o DMSO, solvente utilizado para os peptídeos, e o controle positivo  $\text{AS}_2\text{O}_3$  adotado como indutor de morte celular. Dessa forma, os peptídeos são capazes de induzirem um efeito citotóxico *in vitro* em células de melanoma.



**Figura 16:** Percentual de efeito citotóxico dos compostos isolados por *A. flavus* (N° 6) e *P. variotii* (N° 4) frente a células de melanoma na linhagem A375.



**Figura 17:** Percentual de efeito citotóxico dos compostos isolados por *A. flavus* (N° 6) e *P. variotii* (N° 4) frente a células de melanoma na linhagem WM1366.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este é um trabalho inicial sobre as propriedades químicas e biológicas de compostos produzidos por *A. flavus* e *P. variotti* permitiram as seguintes conclusões:

- Foi possível verificar no solo coletado na reserva ecológica da Universidade Estadual de Goiás a presença de microrganismos produtores de compostos bioativos de interesse industrial.
- Foram selecionadas dois fungos (*Aspergillus flavus* e *Paecilomyces variotii*) e verificou com os bioensaios que estes são candidatos a serem utilizadas em processos farmacológicos, por apresentarem atividade antibacteriana e atividade citotóxica frente a células cancerígenas obtida com baixas concentrações dos compostos em estudo, mostrando-se muito melhor que as moléculas de antimicrobianos tradicionais.
- Nos testes químicos propostos para elucidação das estruturas dos compostos produzidos pelos fungos isolados e identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas demonstrou que é necessária a realização de testes mais específicos e purificação dos compostos extraídos para assim elucidá-las com êxito.
- Os compostos aqui estudados comprovam que o estudo dos metabólitos secundários antimicrobianos pode levar à descoberta de moléculas inéditas, para as quais não existe resistência conhecida, com capacidade de atuar de forma rápida e eficaz sobre as bactérias e doenças que têm causado altos índices de morbi-mortalidade na população.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGRIOS, G. *Patologia das plantas*. Elsevier, 2005.

AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, p.431 – 434, 2011.

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.

ASAFF A.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.; DE LA TORRE M. Isolation of dipicolinic acid as na insectidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 68, p. 542–547, 2005.

ASAFF A.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; DE LA TORRE, M. Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solidstate and liquid fermentations. **Process Biochemistry**, n. 41, p. 1303–1310, 2006.

ATLAS, R. M.; BARTHA R. *Microbial Ecology: fundamentals and Applications*. 3. ed. **The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.**, 1993

AZEVEDO, D. A. Espectrometria de massas. Rio de Janeiro: UFRJ (Laboratório de Espectrometria de Massas. **Departamento de Química Orgânica**. Insituto de Química), 2004.

BALDISSERA, M. A. et al Aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona em alimentos para consume animal no Sul do Brasil – Parte II **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 535, n. 42, p.6, Abril, 1993.

BATISTA, M. de A.; PAIVA, D. W. de; MARCOLINO, A. Solos para todos: perguntas e respostas. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 2014. 87p. (Embrapa Solos. Documentos, 169).

BATISTA, P. P. Caracterização de linhagens do grupo *Aspergillus flavus* baseado em marcadores de DNA. Universidade Federal de Pernambuco, Dissertação de mestrado, Recife, 2007.

BISPO, A. S. R. **Bioprospeção de actinomicetos isolados de solos no estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas**. 2010. 107f. Tese (Dissertação de mestrado em microbiologia agrícola) - Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 2010.

BULL A. T; WARD A. C.; GOODFELLOW M. Search and Discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift.**Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 573-606, 2000.

CARLILE, M. J.; GOODAY, G. W.; WATKINSON, S. C. *The Fungi*. 2. ed. New York: Academic Press, 2001.

CARNEIRO, C. S. **Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo para análise do pescado processado**. Niterói: UFF, 2013. Tese (Doutorado). 89 p.

CASTILHO, M.A.; FELIS, P.; ARAGÓN, P.; CUESTA, C.; SABATER, C.. Biodegradation of the Herbicide Diuron by *Streptomyces* Isolated From Soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.58, p.196-202, 2006.

CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRUGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.

CAVALCANTE, M.F. Síntese de 1,3,5- Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 23, n. 1, 2000.

CHAPLA, V. M. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp. 2014. Disponível em < seb.org.br/eventos/SINCONBIOL2011/PDF/PT0363.pdf> Acesso em 21 ago. 2015.

CHAPMAN, P. M. **Emerging substances – Emerging problems?** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 6. P. 1445-1447, 2006.

\_\_\_\_\_. **Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology**. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, 2002. p. 7 – 15.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: M100- S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3 ed. São Paulo: Ed. Unicamp, 1988. P. 179 – 243.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 302-307, 1997.

DAMÁSIO, A. R. L. **Investigação do sistema pectinolítico produzido pelo fungo *Paecilomyces variotii*: produção, purificação e caracterização bioquímica de uma poligalacturonase**. Ribeirão Preto: USP, 2008. Dissertação (Mestrado). 144 p.

DAVIS, A. N. D.; DIENER, U. L.; ELDRIDGE, D. W. Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 378-380, 1996.

DEDEURWAERDERE, T. From bioprospecting to reflexive governance. **Ecological Economics**, v. 53, p. 473-491, 2005.

EMBRAPA. **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia**. Boletim de

Pesquisa e Desenvolvimento, n. 49. Thaís de Freitas Oliveira et al. (org.). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p.

FURBINO, L. E. *Diversidade e bioprospecção de fungos associados às macroalgas antárticas *Monostroma hariotti* Gain e *Porphyra endiviifolia* (A. Gepp & E.S Gepp) Y.M. Chamberlain*. Dissertação (Mestrado). Universidade. Programa. Cidade, 2012.

GASSEN, J. **Detecção de *Paecilomyces variotii* pela técnica de PCR**. Porto Alegre: UFRGS, 2012. Dissertação (Mestrado). 68 p.

GOUVEA, D. R. **Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão (*Lynchnophora salicifolia* Mart., *Vernoniae*, *Asteraceae*)**. Riberirão Preto: USP, 2010. Dissertação (Mestrado). 44 p.

GREVE, H.; MOHAMED, I. E.; PONTIUS, A.; KEHRAUS, S.; GROSS, H.; KONIG, G. M. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. *Phytochemistry Review*, v. 9, n. 4, p. 537-545, 2010.

GUCKER, B.; BOECHAT, I. G.; GIANI, A. Impacts of agricultural land use on ecosystem structure and whole-stream metabolism of tropical Cerrado streams. **Freshwater Biology**, Chicago, v. 54, n. 10, p. 2069-2085, Oct. 2009.

GUIMARÃES, A. C.; KUSTER, R. M.; NEVES, JR. I.; LOURENÇO, M. C. S.; SARQUIS, M. I. Investigação preliminar da composição micelial e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos da erva-de-passarinho amazônica *Cladocolea micranta* (Eichler) Kuijt (Loranthaceae). **Revista Fitos**, v. 4, n. 2, p. 90-101, 2009.

HARGREAVES, P. I. *Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana*. Dissertação (Mestrado) Universidade. Programa. Rio de Janeiro, 2008.

HENRY, T.; IWEN, P.C.; HINRICHS, L. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, p. 1510-1515, 2000.

HOPWOOD, D. A.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F.; KIESER, T.; BRUTON, C. J.; KIESER, H. M.; LYDIATE, D. J.; SMITH, C. P.; WARD, J. M.; SCHREMPF, H. Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory Manual. **The John Innes Institute, Norwich**, United Kingdom, 1985.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 278-85, 1998.

IKEDA, A. C. **Morfofisiológica e Genética de Bactérias Endofíticas Isoladas de Raízes de Diferentes Genótipos de Milho**. 2010. 100p. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 210-027, 2002a.

- KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002b. 116 p.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPES, J. A. **Dictionary of Fungi**. 10 ed. United Kingdom: Cabi Europe, 2008. 771 p.
- LAI, H.; ZHANG, H.; LIU, R.; LIU, C. Potential for aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples Saudi Journal of Biological Sciences, v. 22, p. 176–180, 2015.
- LI JW,; VEDERAS JC. Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless frontier Science, 2009.
- LIMA, J. E. F. W. Situação e perspectivas sobre as águas do cerrado. *Cienc. Cult.* [online]. v. 63, n.3, p. 27-29, 2011.
- LOPES, F. C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. Porto Alegre: UFRGS, 2011. Dissertação (Mestrado). 130 p.
- LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal Ethnopharmacol.* vol.97, n.2, p. 199-206, 2005.
- MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E. *Mycotoxicology: Introduction to the mycology plant pathology, chemistry, toxicology, and pathology of naturally occurring mycotoxicoses in animal and man*. **Pennsylvania State University Press (University Park)**, Pennsylvania, p. 104, 1987.
- MENDES, I. de C.; REIS JUNIOR, F. B. *Microrganismos do solo a e a sustentabilidade dos agroecossistemas*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/188/>>. Acesso em: 11 ago. 2015.
- MENDONCA, R. C.; FEFILII, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do bioma cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. v. 2, 1279 p.
- MENEZES, M.; ASSIS, S.M.P. Guia prático para fungos fitopatogênicos, 2.ed. Recife: UFRPE, **Imprensa Universitária**, 2004.
- MIAO, F. P.; LI, X. D.; LIU, X. H.; CICHEWICZ, R. H.; JI, N. Y. Secondary Metabolites from an Algicolous *Aspergillus versicolor* Strain. **Marine Drugs**, n. 10, p. 131-139, 2012.
- MOLINAS-SALINAS, G.M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A modified microplate cytotoxicity with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**. V.3, p.633-638, 2006.

MONTEIRO, E. S. Z.; SCABORA M. H.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Efeito do solo com inoculante de microrganismos na fase inicial do crescimento de *Jatropha Curcas* L. em subsolo degradado de cerrado. 2012. Disponível em <<http://www.feis.unesp.br/Home/Eventos/encivi/iiencivi-2008/ettore-s.-z.-monteiro.pdf>> Acesso em 10 ago. 2015.

MONTEIRO, M. C. P. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. Lavras: UFLA, 2012. Dissertação (Mestrado). 76 p.

MORAIS, J. F.; YOSHIMOTO, M.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. *Revista UNINGÁ Review*. v. 17, n.1, p. 27-34, jan./mar., 2014.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: EDUFLA, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation of *Journal of Immunology Methods*, v. 16, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, J. E.; MELO A. F. M.; LIMA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M. 1; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica*. vol.29, n.2, p.145-150, 2008.

NGUTA, L. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacologyonline*, n. 14 (2), p. 358-361, 2012.

NOVAES, M. et al. *Cerrado*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1993.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Revista Saúde Pública*, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

OLIVEIRA, S. D. *Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo*: Estado da Arte. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

OLIVEIRA, K. F.; MALAVOLTA, L.; SOUZA, C. S.; VICENTE, E. J.; LALUCE, C. Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 4, p. 633-640, 2006.

PEIXOTO, R. S.; CHAER, G. M.; FRANCO, N.; REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; ROSADO, A. S. Decade of land use contributes to changes in chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. *Antonie Van Leeuwenhoek, Dordrecht*, v. 98, n. 3, p. 403-413, 2010.

PERRONE G.; VARGA J.; Susca A.; FRISVAD J. C.; STEA G.; KOCSUBÉ S.; TÓTH B.; KOZAKIEWICZ Z.; SAMSON RA. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate

black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007.

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.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. Brine shrimp activity of thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan University Journal*. vol. 12, n. 2, p.13-18, 2004.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage.** 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. *Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos.* Piracicaba: CALO, 2010.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PUTZKE, J. *Os reinos dos fungos.* Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

REHMAN, S. U.; et al. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 333-340, 2005.

REIS, G. M. **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim.** São Paulo: USP, 2009. Dissertação (Mestrado). 41 p.

RITTER, A. C. Potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* Testado em diferentes meios e condições, 2007.

RODRIGUES, G. B.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Dinâmica da regeneração do subsolo de áreas degradadas dentro do bioma Cerrado. *Agriambi*, Campina Grande, v. 11, p. 73-80, 2007.

SACCARO JÚNIOR, N. L. *Bioprospecção e desenvolvimento sustentável.* Desafios do desenvolvimento. Ipea. Ano 9, ed. 73, agosto/2012. Disponível em <://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com\_content&view=article&id=2795:catid=28&Itemid=23> Acesso em 28/11/2015

SALAMANCA, E. F.; RAUBUCH, M.; JOERGENSEN, R. G. Relationships between soil microbial indices in secondary tropical forest soils. *Applied soil Ecology*. n. 21; p. 211-219, 2002.

SALEEMULLAH, A. I. et al. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food Chemistry*, London, v. 98, p. 699-703, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 2, n. 1, p. 843-859, 1989.

SANTOS, M. S.; ORALANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; GARCIA, A.; SILVA, M. C. S.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecção de Fungo Endofítico Isolado de *Passiflora* sp. com Potencial Biotecnológico. *BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports*. v. 2, n. 3, p. 130-133, 2013.

SILVA, M.R.O.; ALMEIDA, A. C.; ARRUDA, F.V.F.; GUSMÃO, N. Endophytic fungi from brazilian mangrove plant *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Combretaceae): their antimicrobial potential. In: Mandez Vilas A. (ed) Science against microbial pathogens: ANDRADE, A. S.; ARAÚJO, F. C.; LIMA, D. T.; CAMPOS, F. M.; PEREIRA, M. C.; DRUMOUND, L. C. D. Atividade Microbiana do Solo Sob Pastagem Intensiva de *Cynodon dactylon* cv. Vaqueiro e Sob Cerrado Nativo. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 1, n. 1, p. 1, 2011.

SILVA, P. Farmacologia 7ª edição, (Ed.). Guanabara Koogan: **Antibióticos e Quimioterápicos. Venenos Animais**. São Paulo, 7. Ed., seção. 9, p. 94-104, 2006.

SIQUEIRA, D. R. Bioprospecção de fungos amazônicos com atividade antifúngica frente aos fitopatógenos de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). 2011. Disponível em <<http://www.pos.uea.edu.br/data/area/titulado/download/27-3.pdf>> Acesso em 10 ago. 2015.

SKOOG, D. A. & LEARY, J. J. High-Performance Liquid Chromatography. In: **Principles of Instrumental Analysis**. 4 ed. Florida: Harcourt Brace College Publishers, 1992. P. 628 – 669.

SORGELOOS, P.; LAVENS, P.; LEGER, P.; TACKAERT, W.; VERSICHELE, D. Manual para el cultivo y uso de artemia em acuicultura. Project reports, n.10, 312p., 1986.  
TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. *Microbiologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2002.

VAAMONDE, G. et al. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section flavi* from diferente substrates in Argentina. *Internacional Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 88, p. 79-84, 2003.

VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally importante *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 627-640, 2004.

VARGAS NETO, P. Ação Antifúngica de Plantas Medicinais e da Própolis Frente a Leveduras do Gênero *Candida* Isoladas da Cavidade Bucal. Dissertação (Mestrado) (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 98f., 2004.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (eds INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego, California. 1990.

YOUNG J. P. W.; DOWNER H L.; EARDLY B D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTai1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271–2277, 1991.

ZHANG, B.; DENG, H.; WANG, H. L.; YIN, R.; HALLETT, P.D.; GRIFFITHS, B.S.; DANIELL, T.J. Does microbial habitat or community structure drive the functional resilience of microbes to stress in severely degraded soils restored with different plant species? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 850-859, 2010.

ZHANG, C.; KE. S.; WANG, J.; GE, Y.; CHANG, S. X.; ZHU, S.; CHANG, J. Responses of microbial activity and community metabolic profiles to plant functional group diversity in a full-scale constructed wetland, **Geoderma**, v. 160, p. 503–508, 2011.

# ANEXOS

# Cromatogramas

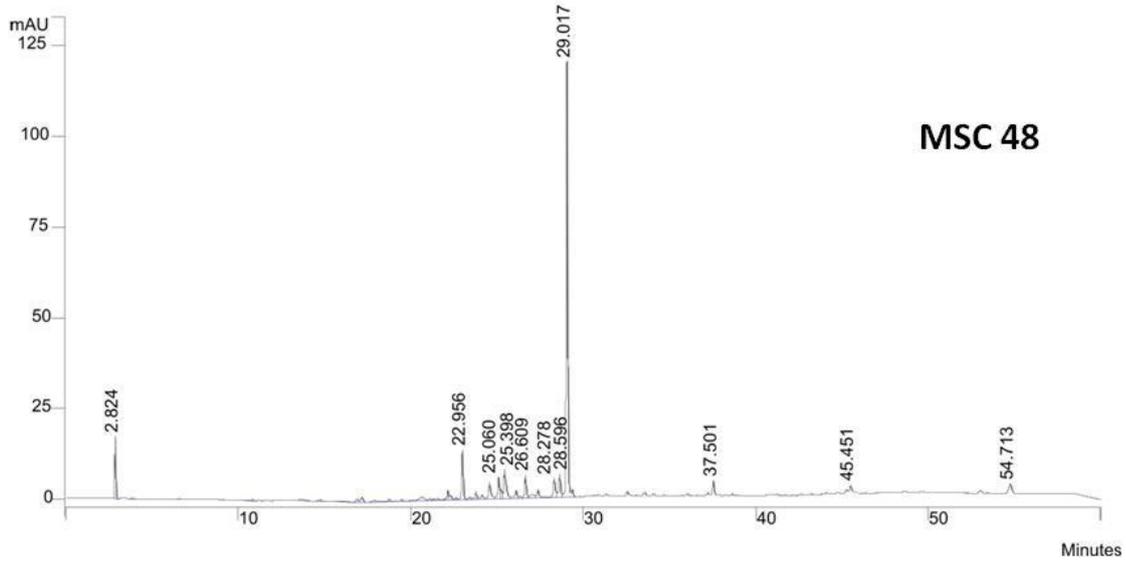


Figura 18 - Cromatograma dos compostos produzidos pelo isolado MSC 48

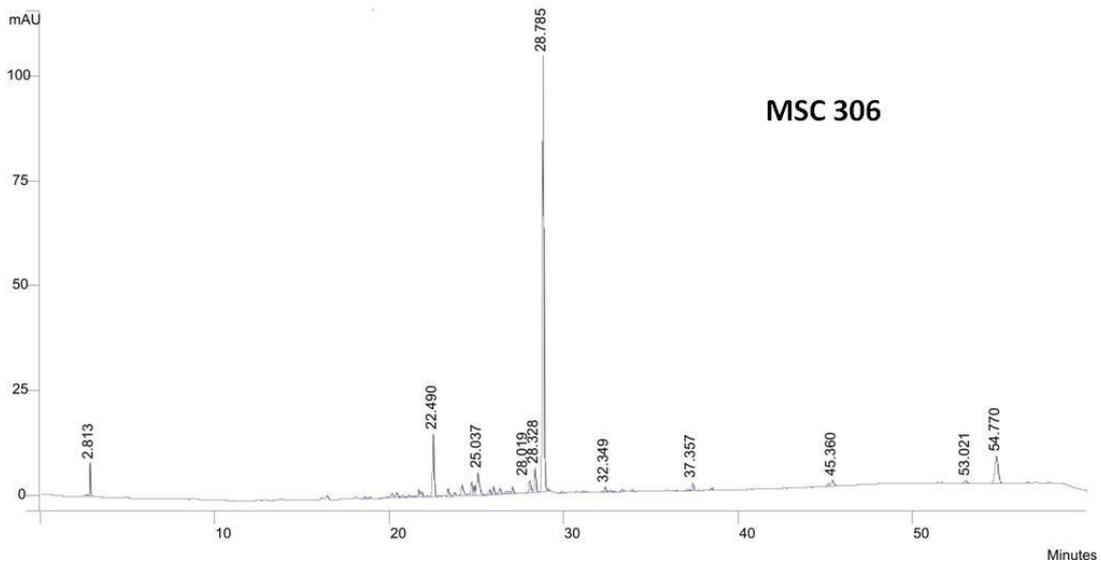


Figura 19 - Cromatograma dos compostos produzidos pelo isolado MSC 306.

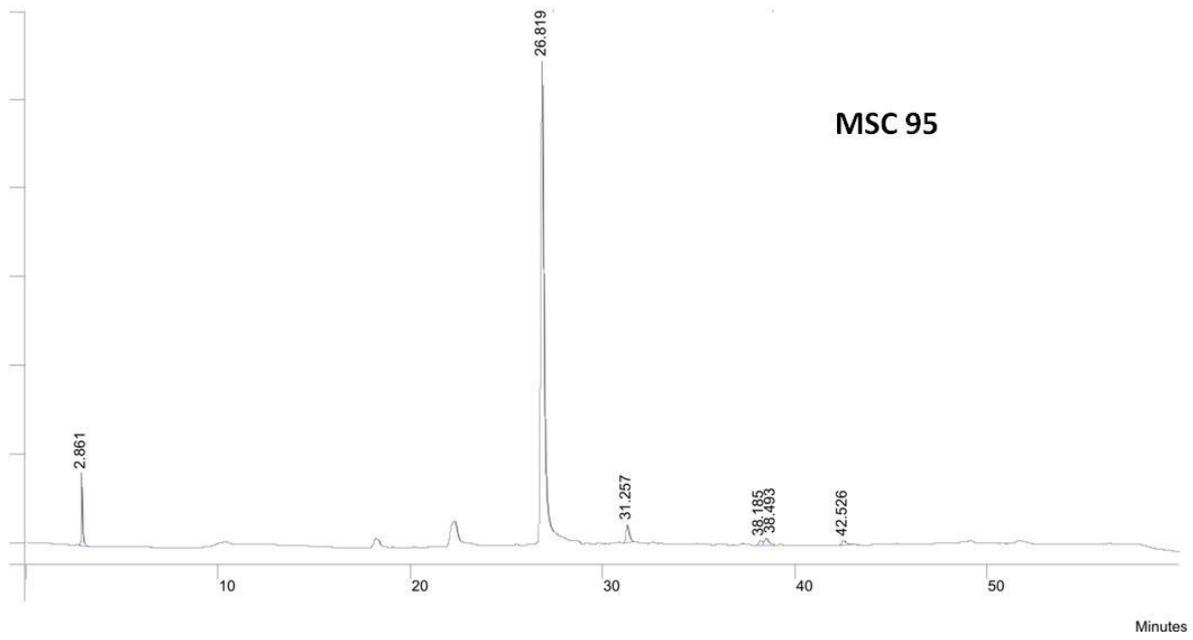


Figura 21 - Cromatograma dos compostos produzidos pelo isolado MSC 95