



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC**



**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE LINHAGENS DE
ASPERGILLUS DA COLEÇÃO DPUA NA PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

FABIANO BRITO PRADO

**MANAUS-AM
MARÇO 2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC



FABIANO BRITO PRADO

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE LINHAGENS DE
***ASPERGILLUS* DA COLEÇÃO DPUA NA PRODUÇÃO DE**
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, em cumprimento as exigências para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS-AM

MARÇO 2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Prado, Fabiano Brito

Comparação de métodos de preservação de linhagens de *Aspergillus* da Coleção DPUA na produção de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano / Fabiano Brito Prado. 2017

40 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Aspergillus*. 2. Antimicrobianos. 3. Difusão em ágar. 4. Bioautografia. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FABIANO BRITO PRADO

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE LINHAGENS
DE *ASPERGILLUS* DA COLEÇÃO DPUA NA PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO**

Aprovado em 30 de Março de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Waldireny Caldas Rocha

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dr. Raimundo Felipe da Cruz Filho

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dr^a. Rosana Antunes Palheta

Instituto Federal do Amazonas - IFAM

Lista de ilustrações e tabelas

Figura 1. Estruturas características do gênero <i>Aspergillus</i>	11
Figura 2. Técnica de difusão em ágar: (A) bloco de gelose; (B) difusão em ágar por poço ou cup-plate.....	13
Equação 1. Fatores de retenção (Rf).....	18
Quadro 1. Exemplos de espécies de <i>Aspergillus</i> produtoras de compostos bioativos.....	12
Quadro 2. Fatores que influenciam nos resultados dos testes bioautográficos.....	15

ARTIGO

Tabela 1. Porcentagem da viabilidade de culturas de <i>Aspergillus</i> preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral por diferentes períodos de estocagem quando cultivadas em ágar Czapek Extrato de levedura (CYA) a 25 °C/ 7dias.....	34
Tabela 2. Atividade antimicrobiana por difusão em ágar de extratos orgânicos de <i>Aspergillus</i> preservados em água destilada esterilizada e sob óleo mineral.....	35
Tabela 3. Bioautografia de espécies de <i>Aspergillus</i> que apresentaram halos de inibição nos testes por difusão em ágar.....	37
Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de <i>Aspergillus</i> contra os micro-organismos teste (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i>).....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
3 OBJETIVOS	16
Objetivo geral.....	16
3.1 Objetivos específicos.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Micro-organismos.....	17
4.2 Viabilidade das espécies de <i>Aspergillus</i>	17
4.3 Produção de metabólitos secundários em meio sólido.....	17
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana em meio sólido.....	17
4.5 Bioautografia.....	18
4.6 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	19
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
7 ARTIGO	27

RESUMO

Fungos continuam sendo uma das fontes mais importantes de compostos bioativos, entre os quais, o gênero *Aspergillus* predomina como uma alternativa para produção de metabólitos secundários de interesse industrial, especialmente como fonte de antimicrobianos, enzimas e antioxidantes. Este trabalho teve como objetivo verificar a influência do método de preservação na atividade de metabólitos secundários e selecionar uma espécie de *Aspergillus* como fonte de compostos com atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), Gram-negativa (*Escherichia coli*) e a levedura *Candida albicans* foi determinada pelas técnicas da difusão em ágar e bioautografia. A viabilidade dos fungos foi realizada com base nas características morfológicas e estruturas de reprodução das espécies de *Aspergillus*. A produção dos compostos bioativos foi realizada em ágar extrato de levedura sacarose (YES). Os extratos orgânicos, etanólico, acetato de etila e hexânico obtidos das culturas foram testados pelo método de difusão em ágar por poço frente a *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Candida albicans* (fungo unicelular). Os resultados mostraram que fungos filamentosos continuam sendo uma das fontes mais importantes de compostos bioativos, entre os quais, o gênero *Aspergillus* predomina como uma alternativa para produção de metabólitos de interesse industrial, a exemplo da Lovastatina e outros antimicrobianos. Os extratos que demonstraram antibiose por difusão em ágar foram analisados pelo método de bioautografia por imersão em ágar e posterior determinação da concentração mínima inibitória (CMI) utilizando o método de diluição em placa multipoços. A viabilidade das espécies de *Aspergillus* predominou nas culturas preservadas em água destilada, o fenômeno do pleomorfismo foi observado em 2,5% e 7,5% das espécies de *Aspergillus* preservadas em água e óleo mineral, respectivamente. A contaminação por outros fungos filamentosos foi constatada em 2,5% tanto nos preservados em água quanto em óleo mineral. O perfil da atividade antimicrobiana por difusão em ágar mostrou a atividade de um a três dos extratos das culturas dos *Aspergillus* de forma predominante frente a *S. aureus*. O crescimento de *E. coli* e *C. albicans* foi inibido somente por extrato acetato de etila de *A. japonicus* DPUA 613 e extrato etanólico de *A. flavo furcatis* DPUA 1451, respectivamente. Na bioautografia, a atividade antimicrobiana foi detectada em diferentes compostos frente a *S. aureus*, variando de uma a três zonas de inibição, na faixa de Rf de 0,70 a 0,81. Neste teste, *A. flavo furcatis* DPUA 1451 foi a única espécie inibidora do crescimento de *C. albicans*, composto de Rf 0,75 constituinte do extrato hexânico. Os dados aqui apresentados mostraram que espécies de *Aspergillus*, ainda que preservadas por diferentes períodos, em condições *in vitro*, sintetizam compostos com atividade antibacteriana e antifúngica capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Palavras-chave: *Aspergillus*, antimicrobianos, difusão em ágar e bioautografia

ABSTRACT

Fungi remain one of the most important sources of bioactive compounds, among which, the genus *Aspergillus* predominates as an alternative for the production of secondary metabolites of industrial interest, especially as source of antimicrobials, enzymes and antioxidants. This work aimed to verify the influence of the preservation method on the activity of secondary metabolites and to select a species of *Aspergillus* as a source of compounds with antimicrobial activity. The antimicrobial activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*), Gram-negative (*Escherichia coli*) and *Candida albicans* yeast was determined by agar diffusion and bioautography techniques. The viability of the fungi was performed based on the morphological characteristics and reproduction structures of the *Aspergillus* species. The production of the bioactive compounds was carried out in yeast extract agarose extract (YES). The organic extracts, ethanolic, ethyl acetate and hexane obtained from the cultures were tested by agar diffusion method against *Staphylococcus aureus* (Gram-positive bacteria), *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Candida albicans* (unicellular fungus). The results showed that filamentous fungi continue to be one of the most important sources of bioactive compounds, among which, the genus *Aspergillus* predominates as an alternative for the production of metabolites of industrial interest, such as Lovastatin and other antimicrobials. The extracts that demonstrated antibiosis by agar diffusion were analyzed by agar immunoassay and subsequent determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) using the multiwell plate dilution method. The viability of *Aspergillus* species predominated in cultures preserved in distilled water, the phenomenon of pleomorphism was observed in 2.5% and 7.5% of the *Aspergillus* species preserved in water and mineral oil, respectively. Contamination by other filamentous fungi was observed in 2.5% in both water and mineral oil preserves. The profile of the antimicrobial activity by diffusion in agar showed the activity of one to three extracts of *Aspergillus* cultures predominantly against *S. aureus*. Growth of *E. coli* and *C. albicans* was inhibited only by ethyl acetate extract of *A. japonicus* DPUA 613 and ethanolic extract of *A. flavo furcatis* DPUA 1451, respectively. In bioautography, antimicrobial activity was detected in different compounds against *S. aureus*, ranging from one to three zones of inhibition, in the Rf range of 0.70 to 0.81. In this test, *A. flavo furcatis* DPUA 1451 was the only growth inhibitory species of *C. albicans*, composed of Rf 0.75 constituent of the hexane extract. The data presented here showed that *Aspergillus* species, although preserved for different periods under *in vitro* conditions, synthesize compounds with antibacterial and antifungal activity capable of inhibiting the growth of *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*.

Keywords: *Aspergillus*, antimicrobials, agar diffusion and bioautography

INTRODUÇÃO

Aspergillus são fungos anamórficos comumente isolados do solo, água, vegetais ou de outros substratos constituídos de nutrientes essenciais para o seu crescimento e reprodução (Teixeira *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2013).

Os representantes do gênero *Aspergillus* têm hábito diverso, certas espécies são agentes comuns de deterioração de alimentos e de outros materiais. Além disso, podem ser patógenos oportunistas de humanos e animais, assim como, certas espécies sintetizam metabólitos tóxicos, a exemplo das micotoxinas. Todavia, existem representantes como *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. japonicus* que são geralmente considerados como seguros [GRAS (Generally Regarded As Safe)], excelentes para uso na indústria biotecnológica por produzirem compostos bioativos de importância industrial (Perrone *et al.*, 2007; Samson e Varga, 2009).

Os produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de doenças humanas. Eles são uma fonte promissora de compostos bioativos e representam um recurso econômico relevante para a indústria de cosméticos e alimentos (Abdel-Hady *et al.* 2016).

Produtos naturais constituem mais de 35% dos candidatos a drogas aprovadas ou pré-aprovadas no período de 1981-2010 e, 48,6% das drogas anticancerígenas, desde 1940, respectivamente. Dentre um milhão de produtos naturais, aproximadamente 25% são biologicamente ativos. Destes, cerca de 60% são originários de plantas e os demais dos micro-organismos, entre os quais, os fungos se destacam como excelentes fontes de compostos com atividade biológica (Chavez *et al.*, 2015).

A habilidade dos fungos em secretar e acumular metabólitos secundários é uma resposta aos desafios dos ambientes e da competição entre espécies (Frisvad e Larsen, 2015). Provavelmente, a evolução dos metabólitos secundários ao longo de milhões de anos está associada à concorrência entre os micro-organismos que utilizam esses produtos naturais para controlar os diversos processos celulares e também para comunicação intra e interespecies (Brakhage, 2013).

Estudos reportam que os *Aspergillus* são fontes ricas de produtos bioativos, especialmente metabólitos secundários, compostos sintetizados na fase estacionária que são estruturalmente heterogêneos e não essenciais para o crescimento microbiano, mas indispensáveis para a defesa nos diversos ecossistemas (Zhang *et al.*, 2016).

Aspergillus terreus produz ácido terrecíclico A (anticancerígeno e antibacteriano) e a Lovastatina, composto usado como redutor dos níveis de colesterol. A asperlicina, produzida por *A. alliaceus* é usada no tratamento de distúrbios neurológicos. A equinocandina B, de *A.*

nidulans é um antifúngico e a fumagilina, de *A. fumigatus* é um inibidor da angiogênese e antiparasitário, são exemplos de compostos sintetizados por fungos do gênero *Aspergillus* (Bracaense e Takahashi, 2014).

2 REVISÃO DA LITERATURA

***Aspergillus*: características, identificação e importância**

O gênero *Aspergillus* foi nomeado e descrito por Micheli em 1729, após observar o fungo no microscópio e se lembrar de um “*aspergillum*”, instrumento usado na igreja católica para borrifar água benta. O gênero está representado por espécies cosmopolitas, que crescem em diversos substratos, em plantas, matéria orgânica em decomposição, solo, ar/bioaerossóis, animais, água doce e marinha. As diversas espécies que compõem o gênero *Aspergillus* são capazes de utilizar uma grande variedade de substratos e adaptadas a diferentes condições ambientais (Paulussen *et al.*, 2016).

Raper e Fennell (1965) descreveram 132 espécies de *Aspergillus* e os classificaram com base nas características morfológicas em 18 grupos. Klich e Pitt (1988), ainda dividiram o gênero em seis subgêneros, cada um contendo uma ou mais seções. Nesta classificação, o termo “Seção” corresponde aos grupos do sistema de Raper e Fennell. A alteração foi necessária porque o termo “grupo” não tem relevância no Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICN).

Samson *et al.* (2014), em sua revisão mantém o conceito amplo de *Aspergillus* e recomenda a importância das características morfológicas e de marcadores de DNA para identificação confiável das espécies. A taxonomia clássica de *Aspergillus* tem como base os caracteres morfológicos, fisiológicos e estruturas reprodutivas citadas por Raper e Fennell.

Aspergillus, gênero anamórfico, se caracteriza pela produção de hifas especializadas, o conidióforo, tem três partes: distintas: (1) a parte basal em forma de “T” ou “L” (célula-pé) às vezes separada por um septo que liga o conidióforo a massa micelial; (2) o estipe, hifa cilíndrica e, (3) a vesícula (extremidade alargada). Na vesícula estão dispostas as células conidiogênicas, as fiálides. Em muitas espécies, entre a vesícula e fiálides estão outras células chamadas metulas. Cabeças conidiais têm apenas fiálides são denominadas unisseriadas, aqueles com fiálides e metulas, bisseriados (Klich e Pitt, 1988) (Figura 1).

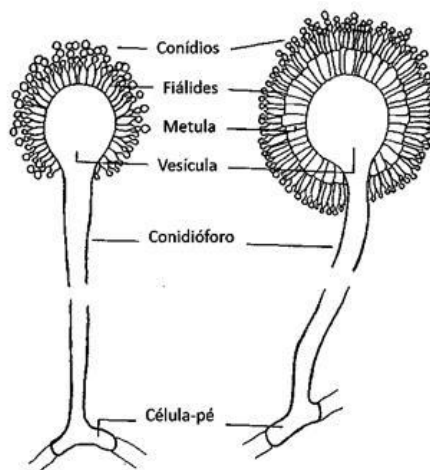


Figura 1. Estruturas características do gênero *Aspergillus*

O impacto econômico e social de certas espécies de *Aspergillus* está associado à produção de compostos bioativos de importância biotecnológica, aos de ação tóxica (micotoxinas) e, as patologias. Entre esses numerosos fungos anamórficos, raras são as espécies que têm impactos na saúde humana ou animal. Infecções são tipicamente causadas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*, sendo *A. fumigatus* o responsável por mais de 90% das infecções seguidos por *A. flavus* e *A. niger* (Reis *et al.*, 2015; Paulussen *et al.*, 2016).

Micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular, cujos efeitos são crônicos (carcinogênico, lesão renal e imunodepressão). Destas, as mais importantes são aflatoxinas B1, G1, B2 e G2, sendo aflatoxina B1 produzida por *A. flavus* e *A. parasiticus* o produto natural mais carcinogênico. Comumente as micotoxinas são contaminantes de grãos armazenados (milho, soja), sementes (amendoim, algodão), amêndoas (castanha do Brasil). Do substrato, entram na cadeia alimentar humana direta (consumo de oleaginosas e derivados) ou indiretamente (consumo leite, carne e ovos) (Iamanaka *et al.*, 2010; Maziero; Bersot, 2010).

Contrário a esses efeitos maléficos, predominam os representantes desse gênero que são úteis em processos industriais por sintetizarem compostos bioativos provenientes do metabolismo primário e/ou secundário que são utilizados em benefício do homem, do meio ambiente e demais seres vivos (Quadro 1). Entre outros, enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, biosurfactantes, antioxidantes, antiprotozoários e antifúngicos tem destaque comercial (Urík *et al.* 2014; Samson *et al.* 2014; Sohail *et al.* 2014; Greco *et al.* 2015; Arzanlou *et al.* 2016).

Quadro 1. Exemplos de espécies de *Aspergillus* produtoras de compostos bioativos.

Espécie	Composto	Referência
<i>A. fumigatus</i>	Acetiltiramina, Cefalimisina A, Asperfumoide e Asperfumina	Zhao <i>et al.</i> 2010; Yamada <i>et al.</i> 2007
<i>A. glaucus</i>	Antraquinona aspergiolida A	Du <i>et al.</i> 2007
<i>A. niger</i>	Alfa-pirona e nigerpironas B e E; Ciclohexanonas e ianutonas D e E	Liu <i>et al.</i> 2011; Bugni <i>et al.</i> 2000
<i>A. ochraceus</i>	Estefacidina A; B, 7-nor-ergosteroide	Von Nussbaum 2003; Cui <i>et al.</i> 2010
<i>A. sydowi</i>	Ác. helvólico	Zhang <i>et al.</i> 2008
<i>A. terreus</i>	Aspernolida A	Parvatkar <i>et al.</i> 2009
<i>A. ustus</i>	Fenilaistina, Sesquiterpenos, Ustusolato E, Ofiobolina G e H	Kanoh <i>et al.</i> 1999; Lu <i>et al.</i> 2009; Lu <i>et al.</i> 2009; Cutler <i>et al.</i> 1984
<i>A. versicolor</i>	Coteslosina A e B, Antraquinonas, Nitrobenzoila ester e xantona	Fremlin <i>et al.</i> 2009; Lee <i>et al.</i> 2010; Belofsky <i>et al.</i> 1998
<i>A. terreus</i>	Lovastatina	Lopez <i>et al.</i> 2003

Substâncias com atividade antimicrobiana têm ampla aplicação na eliminação de patógenos na agricultura, para redução das perdas e na comercialização de grãos, frutas e subprodutos alimentícios, assim como, no controle de fitopatógenos que promovem prejuízos consideráveis na produção ou inviabilizar determinadas áreas para o plantio (Alves e Nunes, 2016).

Antibióticos são substâncias do metabolismo secundário de fungos e bactérias com capacidade de impedir o crescimento ou causar a morte de outros micro-organismos. Os antibióticos também podem ter procedência de síntese, derivados miméticos de produtos naturais, além do metabolismo vegetal. Antibióticos naturais podem ser produzidos via fermentação, em meio líquido, seguido do processo filtração para separação do micélio e, por extrações ao final do bioprocessamento (Takahashi e Lucas, 2008; Pereira e Oliveira, 2016).

Entre os metabólitos secundários de origem fúngica, os antimicrobianos têm despertado grande interesse, levando pesquisadores à realização de diversas investigações objetivando a descoberta de novas moléculas ou compostos para o desenvolvimento de novos antibióticos ou antifúngicos mais eficientes (Cajadoa *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016).

Os derivados semissintéticos e os equivalentes sintéticos de origem microbiana são amplamente utilizados na medicina para o tratamento de uma série de patologias e também no setor agrícola como herbicidas, inseticidas e fungicidas. Porém, o uso indiscriminado desses compostos tem contribuído para o aumento da resistência microbiana a antibióticos que está sendo uma grande ameaça aos cuidados da saúde e agricultura (Rutledge *et al.*, 2015).

Assim sendo, o principal fator que justifica a realização de investigações ainda está sendo o aumento da resistência de bactérias aos antibióticos usados no tratamento de infecções. As linhagens resistentes são de difícil combate e induzem doenças infecciosas graves (Porsani *et al.*, 2013; Pereira; Oliveira, 2016).

Métodos utilizados para análise da atividade antimicrobiana

Nos estudos que envolvem investigação para descoberta de metabólitos com atividade antimicrobiana são realizadas diversas metodologias, cujos resultados são fortemente influenciados, não só pelo método selecionado, mas pelos micro-organismos testados e pelo grau de solubilidade de cada teste (Silveira *et al.*, 2009).

Em função dos fatores que influenciam diretamente no resultado da determinação da atividade antimicrobiana de produtos naturais, não tem metodologia padronizada para expressão dos resultados desse teste (Ostrosky *et al.*, 2008).

Entre métodos empregados para avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais, a exemplo dos extratos obtidos dos cultivos de fungos, comumente são utilizadas técnicas qualitativas, a de difusão em ágar (bloco de gelose e difusão em ágar por poço ou *cup-plate* [Figura 2 (A) e (B)]. Basicamente o método consiste na difusão do biocomposto no ágar, ou seja, as moléculas imersas no meio líquido (extrato) são inoculadas no disco ou um determinado volume de extrato é transferido para um poço de profundidade e diâmetro pré-estabelecido e as placas teste comumente são mantidas 18 h a 24 h, a 37 °C (Sohail *et al* 2014).

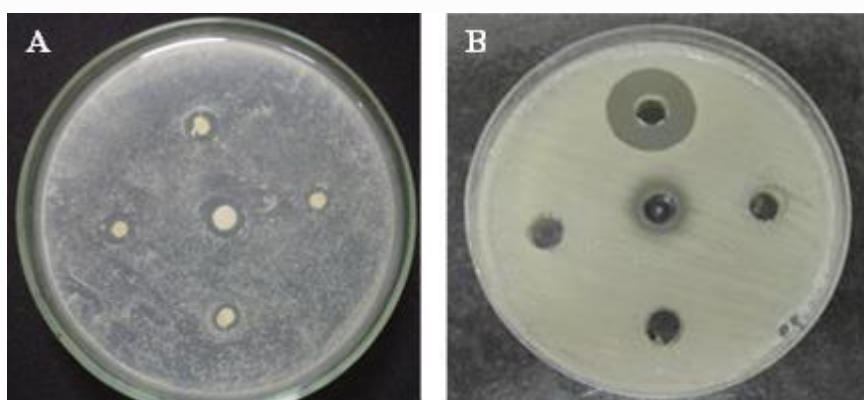


Figura 2. Técnica de difusão em ágar: (A) bloco de gelose; (B) difusão em ágar por poço ou *cup-plate*. Fonte: Acervo da Coleção DPUA/Universidade Federal do Amazonas-UFAM

O teste de difusão em ágar ou difusão em placas consiste em avaliar fisicamente uma espécie microbiana frente a um biocomposto, em meio de cultura sólido. De acordo com cada grupo de micro-organismo teste são utilizados o controle negativo e um positivo. A atividade antimicrobiana é expressa em relação à dimensão da área de inibição (diâmetro do halo) (Ostrosky *et al.*, 2007; Das *et al.* 2010; De Bona *et al.* 2014; Sohail *et al* 2014).

O método de difusão em ágar foi aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards Standards*) (Alves, *et al.*, 2008; Ostrosky *et al.*, 2007).

Apesar disso, o método de difusão em ágar por poço, em caldo e a bioautografia são igualmente aceitáveis para medir qualitativamente a atividade *in vitro* de um composto bioativo de origem antimicrobiana contra um determinado isolado de bactérias ou fungos e também extratos de origem vegetal (Masoko e Eloff, 2005; Abdel-Hady *et al.*, 2016)

Nas análises feitas por Silveira *et al* (2009), concluíram que a técnica de difusão em ágar por poço se mostrou mais sensível comparada a de difusão em disco ao avaliar extratos vegetais hidroalcoólicos de vegetal, destacando que as duas técnicas são benéficas, simples e exigem recurso reduzido para determinação da atividade antimicrobiana.

De Bona *et al.* (2014) quando comparou os métodos de difusão em ágar por poço e por disco para a avaliação da atividade antimicrobiana, a maioria das bactérias teste foram inibidas. Todavia, pela técnica do disco, o quantitativo de bactérias inibidas pelos biocompostos foi reduzido em relação à inibição significativa observada na técnica do poço.

Outro ensaio utilizado para selecionar compostos naturais altamente eficazes, a bioautografia proporciona detecção de compostos com atividade biológica após separação cromatográfica e a determinação da atividade *in situ*, facilita a localização e o isolamento direcionado de constituintes ativos sintetizados por plantas, bactérias ou fungos contra agentes patógenos que afetam humanos ou plantas. (Das *et al.* 2010; Botz, 2013; Dissanayake *et al.*, 2015). E quando há inibição do crescimento microbiano na bioautografia, esse fenômeno é detectado na forma uma zona clara (halo) (Suleiman, *et al.*, 2009)

Entre outras propriedades da bioautografia está o impedimento do isolamento de compostos inativos. Nos ensaios bioautográficos, compostos antimicrobianos insolúveis em água não podem ser detectados, porém aqueles solúveis em água funcionam melhor devido à difusão rápida sobre a superfície da placa de cromatografia de camada delgada (TLC) (Suleiman *et al.*, 2009). Nestas análises, os procedimentos de extração dos compostos devem ser repetidos usando um grande número de sistemas solventes diferentes para separar a maior diversidade de constituintes químicos polares e não polares frequentemente encontrados em extratos brutos.

Nesse contexto, três são as variações de bioautografia que podem ser utilizadas nas investigações para detecção de compostos antimicrobianos (Dewanjee *et al.*, 2015; Balouiri *et al.*, 2016):

(1) Bioautografia de contato ou difusão em ágar, consiste na difusão direta dos biocompostos por contato das cromatoplasmas na superfície do cultivo do micro-organismo teste (Cheng e Wu, 2013). A desvantagem desta técnica é a dificuldade em obter o contato completo entre a cromatoplasma e o ágar;

(2) Bioautografia de imersão ou sobreposição em ágar, o meio de cultura é adicionado na cromatoplaca contendo os biocompostos, posteriormente à solidificação do meio, o micro-organismo teste é semeado no meio. Como opções, inicialmente inocular a suspensão do micro-organismo teste no meio de cultura utilizando *swab*, formando camada uniforme, em toda extensão do meio, ou então, proceder a inoculação ou incorporação do micro-organismo teste ao meio antes que este seja vertido sobre a cromatoplaca;

(3) Bioautografia direta - trata em adicionar de forma direta ou borrifar a cultura do micro-organismo teste em meio líquida na cromatoplaca para crescimento direto sobre a cromatoplaca. Józwiak *et al.*, (2016) recomendada este tipo de bioautografia para detecção e obtenção de resultados consistentes de substâncias bioativas de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* ou *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Todavia a diversidade e variabilidade dos resultados dos testes bioautográficos são influenciados por diversos fatores cromatográficos e microbianos (Botz, 2013), (quadro 2).

Quadro 2. Fatores que influenciam nos resultados dos testes bioautográficos

1. O solvente e a concentração da amostra	6. Resolução de compostos separados
2. A complexidade da amostra	7. Micro-organismo teste
3. Eluentes (fases móveis) e seus aditivos (exemplo: NH ₄ OH)	8. Condições de vida para bactérias de teste (por exemplo, tipo de meio de cultivo, densidade do inóculo)
4. Tipo de adsorvente	9. Pré-condição dos solventes, técnicas de desenvolvimento e condição de detecção pós-cromatográfica
5. Modo de aplicação da amostra	10. Derivação pós-cromatográfica, detecção (por exemplo, humidade da câmara, tempo de incubação, concentração de bactérias, reagente de detecção)

Apesar das vantagens e desvantagens, a bioautografia é um meio de isolamento direcionado de moléculas ativas no cromatograma que continua sendo um instrumento simples, eficiente e economicamente viável para *screening* de compostos de fontes naturais (Dewanjee *et al.*, 2015; Grzelak *et al.*, 2016).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes espécies de *Aspergillus* para verificar a influência do método de preservação na atividade de metabólitos secundários contra bactérias e levedura patogênicas com a finalidade de selecionar uma espécie promissora para futura aplicação industrial.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a viabilidade de 10 *Aspergillus* estocados na Coleção de Culturas DPUA, preservados sob óleo mineral e em água destilada esterilizada;
- Proceder à extração dos metabólitos secundários das culturas viáveis das espécies de *Aspergillus* em ágar Extrato de Levedura Sacarose;
- Avaliar o potencial de espécies de *Aspergillus* na produção de biocompostos com atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar por poço contra diferentes grupos de micro-organismos patogênicos;
- Determinar a atividade antimicrobiana por meio da técnica de bioautografia dos extratos com ação frente aos micro-organismos teste selecionados nos testes de difusão em ágar;
- Determinar a concentração mínima inibitória do extrato selecionado nos testes bioautográficos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Nesta pesquisa foram avaliados 10 representantes do gênero *Aspergillus*, sendo 4 espécies do Grupo Niger (*Aspergillus niger* DPUA 398, *A. niger* DPUA 399, *A. pulverulentus* DPUA 478, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 613, *A. awamori* DPUA 1473) e uma espécie do Grupo Flavus (*Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451, *A. pulverulentus* DPUA 1455, *A. flavo furcatis* DPUA 1461 e *A. flavo furcatis* DPUA 1465), 10 culturas preservadas em óleo mineral e 10 culturas em água destilada esterilizada. Os *Aspergillus* foram cedidos pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

4.2 Viabilidade das espécies de *Aspergillus*

A confirmação da viabilidade dos *Aspergillus* foi realizada nos cultivados ágar Czapek+Extrato de Levedura (CYA), em tubos de ensaio 130 mm x 15 mm. As culturas foram mantidas a 25 °C por sete dias. Para confirmação da viabilidade das espécies foram observadas as características macromorfológicas e as estruturas de reprodução (Raper e Fennel, 1977; Klich e Pitt (1988).

4.3 Produção e extração dos biocompostos

Na determinação da atividade antimicrobiana, as espécies de *Aspergillus* foram cultivadas em Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES), em placa de Petri de 90 mm x 10 mm. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por 12 dias. (Klich e Pitt, 1988; Samson *et al.*, 1995). Para extração dos biocompostos, da área central de cada cultura, discos miceliais foram transferidos para os seguintes solventes orgânicos, hexano, acetato de etila e etanol 95 % [Nuclear®, P.A. (v/v)]. Após 48 horas os extratos foram filtrados em membrana polietersulfônica (0,22 µm), concentrados e redissolvidos em 500 µL de cada um dos solventes extrativos e 500 µL de Dimetilsulfóxido [DMSO 10 % (v/v)] (Silva, 2008).

4.4 Determinação da atividade antimicrobiana em meio sólido

Os extratos foram analisados frente a três micro-organismos teste, *Candida albicans* DPUA 1706, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* CBAM 001. A levedura foi cultivada em ágar Sabouraud a 25 °C por 48 horas e as bactérias em ágar Mueller-Hinton, a 37 °C por 24 horas. Em cada cultura foi preparada suspensão celular equivalente a escala de MacFarland 1. Como controles positivos foram utilizados Itraconazol e Cloranfenicol (200 µg/mL) para levedura e bactérias, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2011). De cada suspensão

celular, 200 µL foram semeados na superfície de ágar Sabouraud ou ágar Mueller Hinton, em placas de Petri (90 mm x 10 mm), formando uma camada uniforme. Em cada poço foi inoculado 100 µL dos extratos orgânicos e dos controles. As placas foram mantidas a 37 °C por 48 horas (levedura) e 24 horas (bactérias). A atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros.

4.5 Bioautografia

Os extratos orgânicos foram diluídos em cada solvente de extração [900 µL (hexano, acetato de etila e etanol 95 % (v/v)) e 100 µL solução aquosa do solvente aprótico e polar DMSO 10 % (v/v)]. Os controles e os extratos orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol) foram aplicados em placa cromatográfica de CCD em sílica gel 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄, suporte em alumínio com espessura de 0,2 mm, medindo 5 cm x 10 cm (MERCCK, Alemanha). A eluição foi feita em cuba cromatográfica utilizando o sistema (Acetato de Etila/Éter de Petróleo [6:4 v/v (Nuclear®, P.A., Brasil)]). Para manter o ambiente saturado no interior do recipiente, foi utilizado papel filtro (15 cm x 15 cm). Ao término da eluição as placas de CCD foram submetidas à secagem. A revelação dos metabólitos foi realizada por meio de uma lanterna de emissão de radiação ultravioleta, com luz branca (normal) e luz ultravioleta (365 nm). Os Rf's (Fator de Retenção) foram determinados por visualização de bandas no cromatograma (Silva *et al.*, 2010).

Para determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado ágar Sabouraud ou ágar Mueller-Hinton, (20 mL/40 °C), contendo revelador Cloreto de Trifeniltetrazolium (TTC) 1,0 % (p/v)]. (500 µL) e suspensão celular de cada micro-organismo teste (500 µL). Essa formulação foi superposta no cromatograma, em placa de Petri (120 mm x 9 mm). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas (levedura) e 24 horas (bactérias). A atividade antimicrobiana foi determinada por visualização da zona de inibição (Silva, 2008; Martins *et al.*, 2012).

$$(Equação 1) \quad R_f = \frac{\text{Distância de migração das moléculas (cm)}}{\text{Distância de migração do solvente (cm)}}$$

Para determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado ágar Sabouraud ou ágar Mueller-Hinton, (20 mL/40 °C), contendo revelador Cloreto de Trifeniltetrazolium 1,0 % (p/v)]. (500 µL) e suspensão celular de cada micro-organismo teste (500 µL). Essa formulação foi superposta no cromatograma, em placa de Petri (120 mm x 9 mm). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas (levedura) e 24 horas

(bactérias). A atividade antimicrobiana foi determinada por visualização da zona de inibição (Silva, 2008; Martins *et al.*, 2012).

4.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A CMI foi realizada de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo, descrita no documento M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). O teste foi realizado em microplaca de 96 poços, em cada poço foi adicionado 100 μL , exceto colunas 1 e 12 (50 μL) dos meios caldo Sabouraud e caldo Müeller-Hinton. Na coluna 1 da placa multipoço foi feito o controle negativo (caldo Sabouraud ou Muller Hinton + extrato orgânico) e coluna 2 foi adicionado 100 μL do extrato de maior concentração em solução aquosa de Dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % (v/v). A partir da coluna 2 foram feitas diluições seriadas, transferindo 100 μL da mistura composta por meio+extrato, sucessivamente até a coluna 11 e desta, foi descartado 100 μL . Em todos os poços exceto a coluna 1 foi inoculado 5 μL da suspensão celular de cada micro-organismo teste, com densidade celular semelhante a escala de MacFarland 0,5. Na coluna 12 (controle positivo) foi inoculado ao meio as soluções de Itraconazol ou Cloranfenicol (50 μL). As placas multipoço foram mantidas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, em todos os poços foi adicionado 10 μL de solução aquosa do revelador Alamar Blue® (resazurina) a 0,1 % (p/v). Os resultados foram visualizados através da alteração da cor, indicando resistência (vermelho) ou sensibilidade (azul). A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento microbiano em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Regasini *et al.*, 2010; De Bona *et al.*, 2014).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nas avaliações dos testes de difusão em ágar frente aos micro-organismos teste estudados neste trabalho foram submetidos a análise estatística descritiva (desvio padrão e média) e ANOVA, com nível de significância de 5 %. As médias diferentes foram analisadas por meio do Teste de Tukey, utilizando-se o programa Minitab 17.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Hady, H.; Abdel-Wareth, M.T. A.; El-Wakil, E. A.; Helmy, E. A. 2016. Identification And Evaluation Of Antimicrobial And Cytotoxic Activities Of *Penicillium islandicum* and *Aspergillus Tamaris* Ethyle Acetate Extracts. World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences. Vol 5, Issue 9.

Abreu, M. M. V.; Tutunji, V. L. 2003. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. Key words: *Aspergillus*, antimicrobials, agar diffusion and bioautography.

Aliabadi, M. A.; Darsanaki, R. K.; Rokhi, M. L.; Nourbakhsh, M.; Raeisi, G. 2012. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. Annals of Biological Research. 3 (8):4189-4191.

Alves, A. L.; Nunes M. 2016. Uso de *Trichoderma* Spp. no Controle de Antracnose na Cultura do Feijoeiro Comum *Phaseolus Vulgaris*. Revista Técnico-Científica do CREA-PR. 4ª ed. pp. 14.

Andreu, C. C. M. F.; Suárez, L. A. D.; Zaragoza, M. T. I., López, C. A.; Machín, G. M.; Lancha, M. R. P.; Gutiérrez, I. R. 2013. Preservation of fungal cultures of medical importance in distilled water. Revista Cubana de Medicina Tropical. 65(3): 361-369.

Arzanlou, M.; Samadi, R.; Frisvad, J. C.; Houbaken, J.; Ghosha, Y. 2016. Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. Mycol Progress (2016) 15:1081–1092. DOI 10.1007/s11557-016-1230-8.

Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6, 71–79.

Boney, B.; Hooper, J.; Parisot, J. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, 1295–1301 doi:10.1093/jac/dkn090.

Botelho, D. M. S.; Resende, M. L. V.; Júnior, P. M. R.; Patrício, F. R. A.; Pereira, E. A.; Carvalho, C. A.; Martins, S. A.; Júnior, M. B. S. 2013. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Salvador – BA.

Botz, L. 2013. Bioassays/Bioautography. Reedijk, J. (Ed.) Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.00035-4.

Borman, A. M.; Szekely, A.; Campbell, C. K.; Johnson, E. M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. Mycopathologia. 161: 361–368. DOI 10.1007/s11046-006-0023-z.

Bracarense, A.A.P.; Takahashi, J.A. 2014. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. Brazilian Journal of Microbiology 45, 1, 313-321.

Brakhage, A. A. 2013. Regulation of Fungal Secondary Metabolism. Nature Reviews

Microbiology. VOL. 11.

Chávez, R.; Fierro, F.; García-Rico, R. O.; Vaca, I. 2015. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 6, Art. 903.

Cheng, Z.; Wu, T. 2013. TLC Bioautography: High Throughput Technique for Screening of Bioactive Natural Products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 16, 531-549.

Clementino, L. C.; Barbosa, C. C.; Silva, D. P. D.; Silva, F. D.; Queiroz, J. C. F. 2015. Bioprospecção de Antibióticos Produzidos por Fungos da Caatinga. *Evidência, Joaçaba* v. 15, n. 1, p. 37-56.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Da Silva, J. C.; Fernandes, O. C. C.; Martins, M. S.; Rodrigues Jr, A. C.; Teixeira, M. F. S. 2010. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 30:48-54

Das, K.; Tiwari, R. K. S.; Shrivastava, D. K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(2), pp. 104-111. DOI: 10.5897/JMPR09.030.

Davis, M. A.; Besser, T. E.; Wiedmann, M. 2011. Agar Disk Diffusion and Automated Microbroth Dilution Produce Similar Antimicrobial Susceptibility Test Results for *Salmonella* Serotypes Newport, Typhimurium, and 4, 5, 12: i-, But Differ in Economic Cost. *Foodborne Pathogens and Disease* Volume 8, Number 12. DOI: 10.1089/fpd.2011.0933.

De Bona, E. A. M.; Pinto, F. G. S.; Fruet, T. K.; Jorge, T. C. M.; Moura, A. C. 2014. Comparação de métodos para avaliação e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225.

Dewanjee, S.; Gangpadhyay, M. Bhattacharya, N. Khanra, R. Dua, T. K. 2015. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*; 5(2):75–84.

Dissanayake, M. L. M. C.; Ito, S. I.; Akakabe, Y. 2015. TLC Bioautography Guided Detection and Biological Activity of Antifungal Compounds From Medicinal Plant *Acorus calamus* Linn. *Asian Journal of Plant Pathology* 9 (1): 16-26.

Elavarasi, M.; Rajeshwari, A.; Sruthi, A. A.; Kumar, D. N.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. 2014. Simple colorimetric sensor for Cr(III) and Cr(VI) speciation using silver nanoparticles as a probe. *Anal. Methods*, 2014, 6, 5161–5167. DOI: 10.1039/c4ay00877d.

Farinas, C. S.; Barboza, D. C. 2012. Fungos Filamentosos de Interesse em Agroenergia: Avaliação de Diferentes Metodologias de Preservação do Fungo *Aspergillus niger*. São Carlos: Embrapa Instrumentação, *Boletim de Pesquisa e desenvolvimento*, 37. 17 p.

Flippi, M.; Sun, J.; Robellet, X.; Karaffa, L.; Fekete, E.; Zeng, A. P. 2009. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genetics and Biology* 46. S19–S44.

Fox, E. M.; Howlett, B. J. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*. 11:481-487.

Frisvad, J. C.; Larsen T. O. 2015. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7859-7877. Doi 10.1007/s00253-015-6839-z.

Greco, M.; Kemppainen, M.; Pose, G.; Pardo, A. 2015. Taxonomic Characterization and Secondary Metabolite Profiling of *Aspergillus* Section *Aspergillus* Contaminating Feeds and Feedstuffs. *Toxins*, 7, 3512-3537; doi:10.3390/toxins7093512.

Grzelak, E. M.; Hwang, C.; Cai, G.; Nam, J. W.; Choules M. P.; Gao, W.; Lankin, D. C.; McAlpine, J. B.; Mulugeta, S. G.; Napolitano, J. G.; Suh, J. W.; Yang, S. H.; Cheng, J.; Hanki, L.; Kim, J. Y.; Cho S. H.; Pauli, G. F.; Franzblau, S. G.; Jaki, B. U. 2016. Bioautography with TLC-MS/NMR for Rapid Discovery of Antituberculosis Lead Compounds from Natural Sources. *ACS Infect Dis* 8; 2(4): 294–301. doi:10.1021/acsinfecdis.5b00150.

Guimarães L. C.; Fernandes, A. P.; Chalfoun, S. M.; Batista, L. R. 2014. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 1, 43-47.

Hoelzer, K.; Cummings, K. J.; Warnick, L. D.; Schukken, Y. H.; Siler, J. D.; Ghron, Y. T.; Iamanaka, B. T.; Oliveira, I. S.; taniwaki, M. H.; Micotoxinas em Alimentos. 2010. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, vol. 7, p.138-161.

Iqbal, Z.; Khan, S. I.; Numan, M.; Jan, S.; Iqbal, M.; Din, Z.; Alam, Z.; Alam, S. S.; Saifullah. 2015. Phytotoxic, cytotoxic and antimicrobial effect of the organic extract of *Aspergillus niger*. *International Journal of Biosciences*. Vol. 6, Num. 10, pp. 90-96.

Irshad, S.; Mahmood, M.; Perveen, F. 2012. In-Vitro Anti-Bacterial Activities of Three Medicinal Plants Using Agar Well Diffusion Method. *Research Journal of Biology*. Vol. 02, Issue 01, pp. 1-8.

Jahromi, M. F.; Liang, J. B.; Ho, Y. W.; Mohamad, R.; Goh, Y. M.; Shokryazdan, P. 2012. Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* Using Agro-Biomass as Substrate in Solid State Fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Artigo 196264. 11 pp. doi:10.1155/2012/196264

Jorgensen, J. H.; Turnidge, J. D. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. www.asmscience.org doi:10.1128/9781555817381.ch71.

Józwiak, G. W.; Dzedzic, B. M.; Jesionek, W.; Zielinski, W.; Waksmundska-Hajnos, M. 2016. Thin-layer chromatography: Direct bioautography as a method of examination of antimicrobial activity of selected *Potentilla* species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 39, N. 5–6, 281–285. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2016.1163466>.

Juiz, P. J. L.; Campos, M. J. A.; Uetanabaro, A. P. T.; Alves, R. J. C.; Lucchese, A. M. 2016. Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* Sobre Periodontopatógenos. Braz. J. Periodontol. Vol. 26 (04).

Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W. 2005. Fungal Secondary Metabolism From Biochemistry To Genomics. Nature Reviews. Microbiology. Vol. 3.

Kirk, P.M., Cannon, P.F, Minter, D.W., Stalpes, J.A. 2008. Dictionary of Fungi. 10 ed. United Kingdom: Cabi Europe, 771 pp.

Klich, M. A.; Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.

Krijghsheld, P.; Bleichrodt, R.; Van Veluw, G.J.; Wang, F.; Müller, W.H.; Dijksterhuis, J.; Wösten, H.A.B. 2013. Development in *Aspergillus*. Studies in Mycology 74: 1–29.

Kwaśniewska, P. W.; Przybyl, A. K.; Cofta, G. 2015. Influence of the medium in bioautography-TLC screening test to the reliability of the results. Ann. WULS - SGGW, For. and Wood Technol. 92.

Martins, M. S.; Teixeira, M. F. S.; Silva, J. C.; Kirsch, L. S.; Fernandes, O. C. C.; Carneiro A. L. B.; Conti, R. D.; Durán, N. 2012. Amazonian Biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-Characterizations, antibacterial activities and their toxicities. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. Vol. 6 (3) 300-311.

Masoko P.; Eloff J. N. 2005. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (12), pp. 1425-1431.

Maziero, M. T.; Bersot, L. S. 2010 Micotoxinas Em Alimentos Produzidos No Brasil. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99.

Nielsen, K. F.; Mogensen, J. M.; Johansen, M.; Larsen, T. O.; Frisvad, J. C. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Anal Bioanal Chem (2009) 395:1225–1242 DOI 10.1007/s00216-009-3081-5.

Ostrosky, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E. L.; Kaneko, T. M.; Nishigawa, S. O.; Freitas, B. R. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 18(2): 301-307.

Panizo, M. M.; Reviákina, V.; Montes, W. González, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada e aceite mineral. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.25 n.1.

Patra, J. K.; Gouda, S.; Sahoo, S. K.; Thatoi, H. N. 2012. Chromatography separation, 1 H NMR analysis and bioautography screening of methanol extract of *Excoecaria agallocha* L. from Bhitarkanika, Orissa, India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine S50-S56.

Paulussen, C., Hallsworth, J., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W., Hamill, P., Blain, D., Rediers, H., Lievens, B. (2016). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology* (IF: 3.99).

- Perrone, G.; Susca, A.; Cozzi, G.; Ehrlich, K.; Varg, J.; Frisvad, J.C.; Meijer, M.; Noonim, P.; Mahakarnchanakul, W.; Samson, R.A. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59: 53–66.
- Pinheiro, E. A. A.; Carvalho, J. M.; Santos, D. C. P.; Feitosa, A. O.; Marinho, P. S. B.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S., Souza, A. L. D.; Marinho, A. M. R. 2013. Chemical constituents of *Aspergillus* sp EJC08 isolated as endophyte from *Bauhinia guianensis* and their antimicrobial activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 85. (4).
- Poloni, A.; Muller, M. V. G.; Pessi, I.; Van Der Sand, S. T. 2008. Análise da Variabilidade Morfológica e Taxa de Crescimento de Culturas Policonidiais e Monoconidiais de *Bipolaris sorokiniana*. *Biociências*, v. 16, n. 1, p. 52-63.
- Porsani, M. V.; Amatuzzi, R. F.; Oliveira, B. H.; Baratto, L. C.; Dalitz, C. A.; Bozza, A.; Marangoni, P. R.; Dalzoto, P. R.; Kolm, H. E.; Pimentel, I. C. 2013. Antimicrobial Potential of Fungi and Actinobacteria Isolated from Sandy Sediments Of Intertidal Regions. *IJPCBS*, 3(3), 899-913.
- Raper, K. B.; Fennell, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. pp.ix+686 pp. ref.55 pp.
- Raper, K. B.; Fennel, D. I. 1977. The Genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Co, New York, 686 pp.
- Rateb, M. E.; Hallyburton, I.; Houssen, W. E.; Bull, M. G.; Santhanam, R.; Jaspars, M. Ebel, R. 2013. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by co-culture. *RSC Advances*, 3, 14444.
- Regasini, L. O.; Pivatto, M.; Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Fusco-Almeida, A. M.; Giannini, M. J. S. M.; Barreiro, E. J.; Siva, D. H. S.; Bolzani, V. S. 2010. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(5): 706-711.
- Reis, R. L. S.; Leão, N. S. R.; Souza, A. F.; Silva, G. K. B.; Luna, M. A. C.; Silva, C. A. A.; Okada, K. 2015. Avaliação do Potencial Biotecnológico de *Aspergillus Parasiticus* Ucp1281 no Biotratamento de Efluentes da Indústria de Laticínios e Produção de Lipídeos. *e-xacta*, Belo Horizonte, v. 8, n. 1, p. 31-42.
- Rutledge, P. J.; Challis, G. L. 2015. Discovery of microbial natural products by activation of silente biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews | Microbiology*. Vol. 13. p. 509.
- Samson, R. A.; Noonim, P.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology* 59: 129–145. doi:10.3114/sim.2007.59.13
- Samson, R. A.; Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Med. Mycol.*, v. 47, p. 13-20.
- Samson, R. A.; Visagie, C. M.; Houbraken, J.; Hong, S. B.; Hubka, V.; Klaassen, C. H. W.; Perrone, G.; Seifert, K. A.; Susca, A.; Tanney, J. B.; Varga, J.; Kocsubé, S.; Szigeti, G.; Yaguchi, T.; Frisvad, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141–173.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 1995. Introduction to food-borne fungi. In Identification of the common food-borne fungi. Wageningen: Central bureau Voor Schimmelcultures. The Netherlands. p. 322.

Sathi, Z. S.; Rahman, M.; Rahman, M. A.; Faruk, A.; Rashid, M. A. 2015. Antimicrobial susceptibility assesment of compound from *Aspergillus fumigatus*. African Journal of Biotechnology. Vol 14(3), pp. 167-170. Doi: 10.5897/AJB2014.13829.

Sen, A.; Batra A. 2012. Evaluation of Antimicrobial Activity of Different Solvent Extracts of Medicinal Plant: *Melia Azedarach L.* International Journal of Current Pharmaceutical Research. Vol 4, Issue 2.

Silva J. C.; Teixeira, M. F. S. 2008. Perfil da Viabilidade Celular e Atividade Antimicrobiana de Espécies de *Penicillium* do Acervo da Coleção de Culturas DPUA. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Silveira, L. M. S.; Olea, R. S. G.; Mesquita, J. S.; Cruz, A. L. N.; Mendes, J. C. 2009. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. Rev. Bras. Farm. 90(2).

Sohail, M. A.; Iqbal, Z.; Sheena, Shujaul M. K., Inayat U. R.; Khan, W.; Asghar, A.; Imran U.; Numan, M. 2014. Antimicrobial activity of mycelial extracts of *Rhizopus stolonifer* against different fungal and bacterial pathogenic strains. International Journal of Biosciences. Vol. 4, No. 7, p. 276-281.

Sousa, M.; Souza, O.; Maciel, M.; Cruz, R.; Rêgo, M. G.; Magalhães O.; Pessoa-Júnior, A.; Porto, A.; Souza-Motta, C. 2015. Keratinolytic potential of fungi isolated from soil preserved at the Micoteca URM. European Journal of Biotechnology and Bioscience. Volume: 3, Issue: 4, 10-15.

Specian, V.; Orlandelli, R. C.; Felber, A. C.; Azevedo, J. C.; Pamphile, J. A. 2014. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde.16(4):345-51.

Suleiman, M. M.; McGaw, L. J.; Naidoo, V.; Eloff, J. N. 2010. Detection of Antimicrobial Compounds By Bioautography of Different Extracts of Leaves of Selected South African Tree Species. *Afr. J. Trad. CAM* . 7 (1): 64 - 78.

Suradkar, K. P.; Hande, D. V. 2016. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 5, Issue 10.

Teixeira, M. F. S.; Silva, T. A.; Palheta, R. A.; Carneiro, A. L. B.; Atayde, H. M. 2011. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada. Edua.

Teixeira, Maria Francisca Simas; Silva, Taciana de Amorim; Palheta, Rosana Antunes; Carneiro, Ana Lúcia Basílio; Atayde, Hérlon Mota. 2011. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas). Manaus: Edua.

Urík, M.; Hlodák, M.; Mikušová, P.; Matúš, P. 2014. Potential of Microscopic Fungi Isolated from Mercury Contaminated Soils to Accumulate and Volatilize Mercury. *Water Air Soil Pollut* 225:2219.

Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. Vol.3 Num. 2 . doi:10.1038/nprot.2007.521.

Zhang, H.; Tang, Y.; Ruan, C.; Bai, X. 2016. Bioactive Secondary Metabolites from the Endophytic *Aspergillus* Genus. *Rec. Nat. Prod.* 10:1 1-16.

ARTIGO

***Aspergillus* FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS CONTRA BACTÉRIAS E FUNGO UNICELULAR**

***Aspergillus* SOURCES OF BIOACTIVE COMPOUNDS AGAINST BACTERIA AND UNICELLULAR FUNGUS**

Fabiano Brito Prado¹, Waldireny Caldas Rocha³, Salomão Rocha Martim²; Mircella Marialva Alecrim², Larissa de Paiva Silva¹; Larissa Svetlana Cavalcante Silva², Taciana de Amorim Silva² Maria Francisca Simas Teixeira³

¹Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC, Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, 69080-900 – Manaus – AM, Brasil; fabiano.prado7@gmail.com, larissa-depaiva@hotmail.com

²Universidade Federal do Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal – Bionorte, Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, 69080-900 – Manaus – AM, Brasil. salomao.martim@gmail.com, mircella.ma@gmail.com, larissasvetlanas@gmail.com

³Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, 69080-900 – Manaus – AM, Brasil. wal2002@gmail.com, mteixeira@ufam.edu.br

ASPERGILLUS FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS CONTRA BACTÉRIAS E FUNGO UNICELULAR

ASPERGILLUS SOURCES OF BIOACTIVE COMPOUNDS AGAINST BACTERIA AND UNICELLULAR FUNGUS

RESUMO

Com o objetivo de verificar a influência do método de preservação na atividade de metabólitos secundários e selecionar espécies de *Aspergillus* como fontes de compostos com atividade antimicrobiana, foi feito um estudo com *Aspergillus* da Coleção de Culturas DPUA. As linhagens foram reativadas e sua viabilidade foi confirmada com base nas características morfológicas e estruturas de reprodução. A produção dos biocompostos foi feita em ágar YES. Os extratos orgânicos etanólico, acetato de etila e hexânico foram testados pelo método de difusão em ágar por poço contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os extratos que apresentaram antibiose neste teste foram analisados por bioautografia de imersão e foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias pelo método de microdiluição em caldo. Os dados aqui apresentados mostraram que espécies de *Aspergillus*, ainda que preservados por diferentes períodos, em condições *in vitro*, sintetizam compostos com atividade antibacterina e antifúngica para inibir o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Palavras-chave: *Aspergillus*, antimicrobianos, difusão em ágar e bioautografia

ABSTRACT

In order to verify the influence of the preservation method on the activity of secondary metabolites and to select species of *Aspergillus* as sources of compounds with antimicrobial activity, this study was made with *Aspergillus* from the Collection of Cultures DPUA. The strains were reactivated and their viability was confirmed based on the morphological characteristics and reproduction structures. The production of the biocompounds was made in YES agar. The organic extracts ethanolic, ethyl acetate and hexane were tested by agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The extracts that presented antibiosis in this test were analyzed by immersion bioautography and were determined at minimum inhibitory concentrations by broth microdilution method. The data presented here showed that *Aspergillus* species, although preserved for different periods under *in vitro* conditions, synthesize compounds with antibacterial and antifungal activity to inhibit the growth of *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*.

Keywords: *Aspergillus*, antimicrobials, agar diffusion and bioautography

INTRODUÇÃO

Os fungos vêm sendo utilizados há anos devido as suas propriedades medicinais. Atualmente, uma variedade de compostos bioativos estão disponíveis comercialmente como produtos farmacêuticos ou alimentícios, como os a penicilina, sintetizado por *Penicillium chrysogenum* e o lentinano, polissacarídeo com ação antitumoral, isolado de *Shiitake*. Outros compostos bioativos produzidos por fungos incluem a ciclosporina, com ação anti-linfocítica e o ácido fusídico, agente anti-infeccioso usado no controle de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Guimarães *et al.*, 2010; Iqbal *et al.*, 2015).

Na diversidade de fungos, espécies de *Aspergillus* se destacam por sintetizarem diversos compostos bioativos, entre os quais, já foram identificados os antimicrobianos. *Aspergillus terreus* é fonte de lovastatina, um agente redutor de colesterol (Jahromi *et al.*, 2012). Além desses, ainda podem ser citados como exemplos a asperlicina, equinocandina B, fumagilina de *A. alliaceus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus* que são usados como antifúngico, inibidor da angiogênese e antiparasitário, respectivamente (Bracarense *et al.*, 2014).

Encontrar novas moléculas que possuem componentes bioativos de fontes naturais são de grande interesse e constituem uma alternativa contra micro-organismos patógenos. Neste contexto os compostos bioativos com atividade antimicrobiana sintetizados por fungos estão ganhando importância em aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (Sathi *et al.*, 2015).

Aspergillus são deuteromicetos que tem distribuição mundial, são isoladas de diversos substratos orgânicos, muitas espécies são oportunistas, causam patologias, tanto para humanos como outros animais, contudo muitas são as espécies de importância biotecnológica, úteis para indústria de alimentos, detergentes e também para melhoramento ambiental (Chen *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2015). Considerando a importância industrial dos *Aspergillus*, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência dos métodos de preservação na síntese de compostos antimicrobianos por espécies de *Aspergillus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

Nesta pesquisa foram avaliados 10 representantes do gênero *Aspergillus*, sendo 4 espécies do Grupo Niger (*Aspergillus niger* DPUA 398, *A. niger* DPUA 399, *A. pulverulentus* DPUA 478, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 613, *A. awamori* DPUA 1473) e uma espécie do Grupo Flavus (*Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451, *A. pulverulentus* DPUA 1455, *A. flavo furcatis* DPUA 1461 e *A. flavo furcatis* DPUA 1465), 10 culturas preservadas em óleo mineral e 10 culturas em água destilada esterilizada. Os *Aspergillus*

foram cedidos pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Viabilidade das espécies de *Aspergillus*

A confirmação da viabilidade dos *Aspergillus* foi realizada nos cultivados ágar Czapek+Extrato de Levedura (CYA), em tubos de ensaio 130 mm x 15 mm. As culturas foram mantidas a 25 °C por sete dias. Para confirmação da viabilidade das espécies foram observadas as características macromorfológicas e as estruturas de reprodução (Raper e Fennel, 1977; Klich e Pitt (1988).

Produção e extração dos biocompostos

Na determinação da atividade antimicrobiana, as espécies de *Aspergillus* foram cultivadas em Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES), em placa de Petri de 90 mm x 10 mm. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por 12 dias. (Klich e Pitt, 1988; Samson *et al.*, 1995). Para extração dos biocompostos, da área central de cada cultura, discos miceliais foram transferidos para os seguintes solventes orgânicos, hexano, acetato de etila e etanol 95 % (v/v). Após 48 horas os extratos foram filtrados em membrana polietersulfônica (0,22 µm), concentrados e redissolvidos em 500 µL de cada um dos solventes extrativos e 500 µL dimetilsulfóxido 10 % (v/v) e (Silva, 2008)

Determinação da atividade antimicrobiana em meio sólido

Os extratos foram analisados frente a três micro-organismos teste, *Candida albicans* DPUA 1706, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* CBAM 001. A levedura foi cultivada em ágar Sabouraud a 25 °C por 48 horas e as bactérias em ágar Mueller-Hinton, a 37 °C por 24 horas. Em cada cultura foi preparada suspensão celular equivalente a escala de MacFarland 1. Como controles positivos foram utilizados Itraconazol e Cloranfenicol (200 µg/mL) para levedura e bactérias, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2011). De cada suspensão celular, 200 µL foram semeados na superfície de ágar Sabouraud ou ágar Mueller Hinton, em placas de Petri (90 mm x 10 mm), formando uma camada uniforme. Em cada poço foi inoculado 100 µL dos extratos orgânicos e dos controles. As placas foram mantidas a 37 °C por 48 horas (levedura) e 24 horas (bactérias). A atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros.

Bioautografia

Os extratos orgânicos foram diluídos em cada solvente de extração [900 µL (hexano, acetato de etila e etanol 95 % (v/v))] e 100 µL solução aquosa de DMSO 10 % (v/v). Os controles e os extratos orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol) foram aplicados em placa cromatográfica de CCD em sílica gel 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄, suporte em alumínio com espessura de 0,2 mm, medindo 5 cm x 10 cm (MERCK, Alemanha). A eluição foi feita em cuba cromatográfica utilizando o sistema (Acetato de Etila/Éter de Petróleo [6:4 v/v (Nuclear, Brasil)]. Para manter o ambiente saturado no interior do recipiente, foi utilizado papel filtro (15 cm x 15 cm). Ao término da eluição as placas de CCD foram submetidas à secagem. A revelação dos metabólitos foi realizada por meio de uma lanterna de emissão de radiação ultravioleta, com luz branca (normal) e luz ultravioleta (365 nm). Os RFs (Fator de Retenção) foram determinados por visualização de bandas no cromatograma (Silva *et al.*, 2010).

Para determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado em um frasco de Erlenmeyer, ágar Sabouraud ou ágar Mueller-Hinton, (20 mL/40 °C), 500 µL Solução reveladora [Cloro de Trifeniltetrazolium 1,0 % (p/v)] e suspensão celular de cada micro-organismo teste (500 µL). Essa formulação, após homogeneização, foi superposta no cromatograma, acondicionado em placa de Petri (120 mm x 9 mm). Após solidificação do meio, os cromatogramas foram incubados a 37 °C por 48 horas (levedura) e 24 horas (bactérias). A atividade antimicrobiana foi determinada por visualização da zona de inibição (Silva, 2008; Martins *et al.*, 2012).

Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A CMI foi realizada de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo, descrita no documento M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). O teste foi realizado em microplaca de 96 poços, em cada desses poços foram adicionados 100 µL de caldo Sabouraud para levedura ou caldo Müeller-Hinton para bactérias. O controle negativo foi feito na coluna 1 (meio de cultura + extrato orgânico); e, na coluna 2 foi adicionado [100 µL do extrato (500mg/mL) diluído em solução aquosa de DMSO 10 % (v/v). A partir da coluna 2 foram feitas as diluições seriadas, transferindo 100 µL da mistura composta por meio + extrato até a coluna 11. As concentrações finais dos micro-organismos teste foram de 5×10^5 UFC/mL para *S. aureus* e *E. coli* e, $2,5 \times 10^3$ para *C. albicans*. Itraconazol e Cloranfenicol foram utilizados como controles positivos. As placas multipoço foram mantidas a 37 °C por 24 horas para bactérias e 48 horas para levedura. Após esse período, em todos os poços foi adicionado 10 µL de solução aquosa do revelador Alarmar Blue® (resazurina) a 0,1 % (p/v).

Os resultados foram visualizados através da alteração da cor, indicando resistência (vermelho) ou sensibilidade (azul). A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento microbiano em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Regasini *et al.*, 2010; De Bona *et al.*, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta o resultado da avaliação e viabilidade das linhagens de *Aspergillus*, do Grupo Flavus e do Grupo Níger, preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral por diferentes períodos de estocagem (2–23 anos). Com base nas características morfológicas das colônias, estruturas vegetativas e reprodução, predominou a viabilidade das espécies preservadas em água. De forma transitória o fenômeno do pleomorfismo foi observado em 2,5 % e 7,5 % das espécies de *Aspergillus* preservadas em água e óleo mineral, respectivamente. A contaminação por outros fungos filamentosos foi constatada em 2,5 % tanto nos preservados em água quanto em óleo mineral.

Com base nos dados apresentados na tabela 1, as alterações verificadas nas culturas foram independentes do tempo de preservação, contudo, no método de conservação em óleo mineral a eficácia foi reduzida comparada ao da água destilada esterilizada em relação a viabilidade e autenticidade das culturas dos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Os resultados aqui apresentados estão em concordância com citações da literatura (Sola *et al.*, 2012; Abreu e Tutunji, 2008). Em outra investigação, quando fungos filamentosos foram avaliados, houve distinta variação da viabilidade associada ao tempo de preservação dos fungos estocados por 2-21 anos em água destilada esterilizada (Borman *et al.*, 2006).

O método de preservação em água proporciona alta taxa de viabilidade, pureza, além de assegurar a estabilidade dos fungos. Em contrapartida, no método de preservação em óleo ocorre redução da atividade metabólica e, continuidade da oxigenação que pode viabilizar o crescimento e a variabilidade genética (Farinas e Barboza, 2012).

Considerando que a diversidade dos representantes do Reino Fungi e demais micro-organismos, não existe uma técnica padronizada para preservação, assim sendo, a escolha do método está comumente na dependência da manutenção das propriedades fenotípicas, genotípicas, biotecnológicas e virulência (Girão *et al.*, 2004; Botelho *et al.*, 2012). Panizo *et al.* (2005) recomenda que seja feito rigoroso controle da viabilidade dos micro-organismos preservados em água e óleo para que sejam mantidas suas características durante o período de armazenamento em coleções.

Tabela 1. Porcentagem da viabilidade de culturas de *Aspergillus* preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral por diferentes períodos de estocagem quando cultivadas em ágar Czapek Extrato de levedura (CYA) a 25 °C/ 7dias.

Espécies	Ano/ Estocagem	Tempo/ Estocagem (anos)	Culturas de <i>Aspergillus</i>			
			Preservadas em água		Preservadas sob óleo	
			Testado (%)	Recuperado (%)	Testado (%)	Recuperado (%)
<i>A. niger</i> DPUA 398 ¹	1993	23	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50
<i>A. niger</i> DPUA 399 ¹	2014	3	1/2,50	1/2,50**	1/2,50	1/2,50**
<i>A. pulverulentus</i> DPUA 478 ¹	1993	23	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50
<i>A. japonicus</i> DPUA 542 ¹	2009	8	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50
<i>A. japonicus</i> DPUA 613 ¹	1993	23	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50*
<i>A. awamori</i> DPUA 1473 ¹	2015	2	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 ²	2003	14	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1455 ²	2003	14	1/2,50	1/2,50*	1/2,50	1/2,50**
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1461 ²	2009	8	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50**
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 ²	2002	15	1/2,50	1/2,50	1/2,50	1/2,50
Total (n/%)			10/100	10	10/100	10

¹Grupo Niger 2Grupo Flavus; *Contaminação no período da reativação; ** Pleomorfismo transitório

Neste estudo também foi avaliada a eficácia das espécies de *Aspergillus* na produção de compostos extracelulares para determinar a atividade antimicrobiana frente a bactérias e levedura do gênero *Candida*.

A tabela 2 demonstra os três solventes orgânicos, em ordem decrescente de polaridade, etanol, acetato de etila, hexano, utilizados para extração dos biocompostos e a atividade antimicrobiana dos extratos recuperados dos cultivos dos *Aspergillus* preservados em água destilada esterilizada ou óleo mineral. A atividade antimicrobiana dos *Aspergillus* foi diversa, duas espécies não se mostraram eficaz, assim como, a inibição do crescimento dos micro-organismos teste foi observada em um ou três dos extratos avaliados, com diferença significativa entre as medidas dos halos, nos testes de difusão em ágar.

Quando foram avaliados os extratos orgânicos dos fungos preservados em água destilada esterilizada frente aos micro-organismos teste, os compostos dos extratos de *A. niger* DPUA 398 inibiram de forma significativa somente o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Os biocompostos dos extratos de *A. niger* DPUA 399, *A. japonicus* DPUA 542; *A. japonicus* DPUA 613; *A. awamori* DPUA 1473 foram ativos exclusivamente contra as bactérias teste avaliadas nesta pesquisa. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi sensível aos extratos de *A. niger* DPUA 398, com exceção do extrato hexano do preservado em óleo mineral. Entre estes preservados, ainda foi observada a inibição de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pelos extratos etanol de *A. niger* DPUA 399 e de *A. japonicus* DPUA 542.

Para os espécimes preservados em água, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 demonstraram sensibilidade aos extratos acetato de etila de *A. japonicus* DPUA 613, enquanto o extrato etanol de *A. awamori* DPUA 1473 exclusivamente para *S. aureus*. Do total de extratos avaliados, os biocompostos do extrato etanólico de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451 foram os únicos que inibiram o crescimento de *Candida albicans* e, entre as bactérias, *Staphylococcus aureus*. Já *A. flavo furcatis* DPUA 1465, o extrato etanol inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Nos testes de difusão em ágar por poço, os compostos de *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. flavo furcatis* DPUA 1461, *A. pulverulentus* DPUA 478 não inibiram o crescimento de nenhum dos três micro-organismos teste.

Os dados obtidos mostraram a seletividade da atividade antimicrobiana dos compostos das espécies de *Aspergillus* quando pareados aos micro-organismos teste, provavelmente esses dados estejam relacionados ao método, as condições de extração dos compostos e também da forma como os fungos foram submetidos a crescimentos.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana por difusão em ágar de extratos orgânicos de *Aspergillus* preservados em água destilada esterilizada e sob óleo mineral.

Espécie	EO	Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos					
		Preservados/água destilada			Preservados/óleo mineral		
		Ca	Ec	Sa	Ca	Ec	Sa
<i>A. niger</i> DPUA 398 ¹	Hex	R	R	1,5 ^c	R	R	R
	Ac	R	R	2,1 ^b	R	R	2,0 ^b
	Et	R	R	2,9 ^a	R	R	2,1 ^b
<i>A. niger</i> DPUA 399 ¹	Hex	R	R	R	R	R	R
	Ac	R	R	R	R	R	R
	Et	R	R	R	R	R	2,2 ^b
<i>A. japonicus</i> DPUA 542 ¹	Hex	R	R	R	R	R	R
	Ac	R	R	R	R	R	R
	Et	R	R	R	R	R	1,6 ^c
<i>A. japonicus</i> DPUA 613 ¹	Hex	R	R	R	R	R	R
	Ac	R	1,7 ^c	1,8 ^c	R	R	R
	Et	R	R	R	R	R	R
<i>A. awamori</i> DPUA 1473 ¹	Hex	R	R	R	R	R	R
	Ac	R	R	R	R	R	R
	Et	R	R	2,4 ^b	R	R	R
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 ²	Hex	R	R	R	R	R	R
	Ac	R	R	R	R	R	R
	Et	3,2 ^a	R	1,6 ^c	R	R	R
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 ²	Hex	R	R	R	R	R	R
	Ac	R	R	R	R	R	R
	Et	R	R	1,3 ^c	R	R	R

¹Grupo Niger ²Grupo Flavus; EO = extrato orgânico; Ac = acetato de etila; Et = Etanol 95%; Hex = Hexano; Ca: *Candida albicans* DPUA 1706; Ec: *Escherichia coli* CBAM 001; Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; R= resistente (não houve desenvolvimento de halo de inibição); S= sensível (houve desenvolvimento de halo de inibição).

Bioautografia é um método que tem sido utilizado para determinação dos efeitos de bioatividade de substâncias, após separação cromatográfica, a exemplo das características antimicrobianas. Esta técnica eficiente e tem sido utilizada a mais de 60 anos para a identificação rápida de substâncias (Suleiman *et al.*, 2010; Botz, 2013 Józwiak *et al.*, 2016). Neste estudo, a bioautografia por imersão em ágar foi o método utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana dos biocompostos dos extratos orgânicos das espécies de *Aspergillus*. Os resultados das quatro espécies de *Aspergillus* selecionadas no teste de difusão em ágar por poço estão demonstrados na tabela 3. O fator de retenção (Rf) dos compostos variou de 0,70 a 0,88 variando a coloração ente azul e verde.

Os extratos hexano, acetato de etila e etanol de *Aspergillus japonicus* DPUA 613 e *A. awamori* 1473 inibiram o crescimento de *S. aureus* (Tabela 3). Enquanto para as demais espécies, somente os extratos hexano e acetato de etila de *Aspergillus japonicus* DPUA 542, *A. niger* DPUA 399, *A. flavo furcatis* DPUA 1451, *A. flavo furcatis* DPUA 1465 foram ativos contra *S. aureus*. Da totalidade de extratos testados, *C. albicans* foi sensível apenas para o extrato hexano de *A. flavo furcatis* DPUA 1451 (Tabela 3).

A atividade antimicrobiana determinada por bioautografia mostrou a propriedade antimicrobiana dos *Aspergillus*, contudo estudos mais detalhados devem ser realizados para ampliar o quantitativo e revelar compostos ativos detectados pelo método de difusão em ágar por poço. Apesar dessa condição, entre os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana, os bioautográficos revelaram diferentes compostos extracelulares com atividade frente a *S. aureus*, *E. coli* ou *C. albicans*.

Os fungos são fontes de metabólitos, produtos naturais sintetizados por diferentes vias, muitas vezes após o crescimento ativo ter cessado, a exemplo dos metabólitos secundários. Os metabólitos secundários são produzidos por espécies geneticamente distintas, cuja síntese pode sofrer influência das condições ambientais (temperatura, pH, luz e nutrientes) (Keller *et al.*, 2005; Flipphi *et al.*, 2007; Fox; Howlett, 2008; Specian *et al.*, 2014).

Tabela 3. Bioautografia de espécies de *Aspergillus* que apresentaram halos de inibição nos testes por difusão em ágar.

Espécie	Extratos Orgânicos	Rf $\lambda=365\text{nm}$	Atividade antimicrobiana		
			Ca	Ec	Sa
<i>Aspergillus niger</i> DPUA 398 (água)	Hex	0,78 (azul)	R	R	S
	Ac	0,78 (verde)	R	R	R
	Et	0,80 (azul)	R	R	R
<i>A. niger</i> DPUA 398 (oleo)	Hex	0,76 (azul)	R	R	R
	Ac	0,75 (azul)	R	R	S
	Et	0,76 (azul)	R	R	S
<i>A. niger</i> DPUA 399 (oleo)	Hex	0,71 (azul)	R	R	S
	Ac	0,71 (verde)	R	R	S
	Et	0,71 (azul)	R	R	R
<i>A. japonicus</i> DPUA 542 (óleo)	Hex	0,70 (azul)	R	R	S
	Ac	0,72 (azul)	R	R	S
	Et	0,73 (azul)	R	R	R
<i>A. japonicus</i> DPUA 613 (água)	Hex	0,74 (azul)	R	R	S
	Ac	0,74 (azul)	R	R	S
	Et	0,75 (verde)	R	R	S
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 (água)	Hex	0,75 (azul)	S	R	S
	Ac	0,76 (verde)	R	R	S
	Et	0,88 (azul)	R	R	R
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 (água)	Hex	0,74 (azul)	R	R	S
	Ac	0,74 (azul)	R	R	S
	Et	0,75 (azul)	R	R	R
<i>A. awamori</i> DPUA 1473 (água)	Hex	0,80 (azul)	R	R	S
	Ac	0,80 (verde)	R	R	S
	Et	0,81 (verde)	R	R	S

A tabela 4 demonstra a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pela técnica de microdiluição em caldo. A CMI determina a menor quantidade do composto bioativo capaz de inibir o crescimento microbiano em condições padronizadas (Oliveira *et al.*, 2009). A determinação da CMI pela técnica de microdiluição tem se demonstrado favorável devido à sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, fatores que proporcionam um maior número de replicações e o aumento da confiabilidade dos dados (Ostrosky *et al.*, 2008).

Os resultados da CMI identificados para as espécies selecionadas por bioautografia revelaram que, os extratos orgânicos de baixa e média polaridade foram os de maior eficiência na atividade antimicrobiana para *S. aureus*, entre os quais teve evidência o acetato de etila com CMI 15,62. Nas condições de análise desta investigação, para os extratos avaliados, a CMI variou de 15,62 a 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, frente aos micro-organismos examinados. Nessa análise, *E. coli* e *C. albicans* foram os micro-organismos mais resistente, apenas o extrato etanol de *A. flavo furcatis* DPUA 1451, preservado em água, foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* com CMI equivalente a 15,62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Ainda que inexista uma padronização para a

CMI de produtos naturais, dados da literatura revelam que a CMI inferior a 1 mg/mL pode ser considerada como ótima quando comparado a antibiótico padrão (Juiz *et al.*, 2016).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *Aspergillus* contra os micro-organismos teste (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*).

Espécies/Método de Preservação	Extratos orgânicos	Micro-organismo teste	CMI ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
<i>A. niger</i> DPUA 398 (água)	Hexano	<i>S. aureus</i>	31,25
<i>A. niger</i> DPUA 398 (óleo)	Etanol 95%	<i>S. aureus</i>	250
<i>A. niger</i> DPUA 399 (óleo)	Acetato de etila	<i>S. aureus</i>	125
<i>A. japonicus</i> DPUA 542 (óleo)	Acetato de etila	<i>S. aureus</i>	125
<i>A. japonicus</i> DPUA 613 (água)	Acetato de etila	<i>S. aureus</i>	250
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 (água)	Acetato de etila Hexano	<i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i>	15,62
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 (água)	Acetato de etila	<i>S. aureus</i>	250
<i>A. awamori</i> DPUA 1473 (água)	Etanol 95%	<i>S. aureus</i>	125

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa conduziram a seguinte conclusão:

1. O método de água destilada promoveu a maior estabilidade e pureza das culturas dos *Aspergillus*, independente do tempo de armazenamento em comparação ao método de conservação em óleo mineral, sobretudo em relação ao fenômeno do pleomorfismo;
2. A atividade antimicrobiana por difusão em ágar mostrou a eficácia predominante dos biocompostos dos *Aspergillus* frente a *S. aureus*. O crescimento de *E. coli* e *C. albicans* foi inibido apenas por *A. japonicus* DPUA 613 e *A. flavo furcatis* DPUA 1451, respectivamente;
3. Os testes de bioautografia mostraram a ação de diversos compostos sintetizados pelos diversos *Aspergillus* com atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e confirmaram *A. flavo furcatis* DPUA 1451 como fonte de antifúngico para inibir o crescimento de *C. albicans*;
4. Com base nos valores de CMI relativa aos extratos avaliados, os compostos de *A. flavo furcatis* DPUA 1451 apresentam potencial antibacteriano frente a *S. aureus* antifúngico à *C. albicans*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio técnico científico e financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. M. V., TUTUNJI, V. L. 2003. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitás Ciências da Saúde**. 2(2): 236-251.

BORMAN, A. M., SZEKELY, A., CAMPBELL, C. K., JOHNSON, E. M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. **Mycopathologia**. 161: 361–368.

BOTELHO, D. M. S., RESENDE, M. L. V., JÚNIOR, P. M. R., PATRÍCIO, F. R. A., PEREIRA, E. A., CARVALHO, C. A., MARTINS, S. A., JÚNIOR, M. B. S. 2013. **VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 1-4.

BOTZ, L. 2013. Bioassays/Bioautography. Reedijk, J. (Ed.) **Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. 1: 1-10.

BRACARENSE, A.A.P.; TAKAHASHI, J. A. 2014. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology** 45(1): 313-321.

CHEN, Y.; MAO, W.; TAO, H.; ZHU, W.; QI, X.; CHEN, Y.; LI, H.; ZHAO, C. YANG, Y.; HOU, Y.; WANG, C.; LI, N. 2011. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. **Bioresource Technology**. 102: 8179–8184.

DE BONA, E. A. M., PINTO, F. G. S., FRUET, T. K., JORGE, T. C. M., MOURA, A. C. 2014. Comparação de métodos para avaliação e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.** 81(3): 218-225.

FARINAS, C. S., BARBOZA, D. C. 2012. Fungos Filamentosos de Interesse em Agroenergia: Avaliação de Diferentes Metodologias de Preservação do Fungo *Aspergillus niger*. São Carlos: Embrapa Instrumentação, **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento.** 37: 1-17.

FLIPPPI, M., Sun, J., ROBELLE, X., KARAFFA, L., FEKETE, E., ZENG, A. P. 2009. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. **Fungal Genetics and Biology.** 46: 19-44.

FOX, E. M., HOWLETT, B. J. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology.** 11:481-487.

GIRÃO, M. D., PRADO, M. R., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R. A., MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 37(3): 229-233.

GUIMARÃES L. C.; FERNANDES, A. P.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. 2014. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** 45(1): 43-47.

IQBAL, Z.; KHAN, S. I.; NUMAN, M.; JAN, S.; IQBAL, M.; DIN, Z.; ALAM, Z.; ALAM, S. S.; SAIFULLAH. 2015. Phytotoxic, cytotoxic and antimicrobial effect of the organic extract of *Aspergillus niger*. **International Journal of Biosciences.** 6(10): 90-96.

JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; Ho, Y. W.; MOHAMAD, R.; GOH, Y. M.; SHOKRYAZDAN, P. 2012. Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* Using Agro-Biomass as Substrate in Solid State Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** 196264. 11 pp. doi:10.1155/2012/196264.

JÓZWIAK, G. W.; DZIEDZIC, B. M.; JESIONEK, W.; ZIELINSKI, W.; WAKSMUNDSKA-HAJNOS, M. 2016. Thin-layer chromatography: Direct bioautography as a method of examination of antimicrobial activity of selected *Potentilla* species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 39(5–6): 281–285.

JUIZ, P. J. L., CAMPOS, M. J. A., UETANABARO, A. P. T., ALVES, R. J. C., LUCCHESI, A. M. 2016. Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* Sobre Periodontopatógenos. **Braz. J. Periodontol.** 26(04):07-14.

KELLER, N. P., TURNER, G., BENNETT, J. W. 2005. Fungal Secondary Metabolism From Biochemistry To Genomics. **Nature Reviews, Microbiology**. 3:1-11.

KLICH, M. A., PITT, J. I. 1988. **A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. 1-115. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, Australia.

MARTINS, M. S., TEIXEIRA, M. F. S., SILVA, J. C., KIRSCH, L. S., FERNANDES, O. C. C., CARNEIRO A. L. B., CONTI, R. D., DURÁN, N. 2012. Amazonian Biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-Characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**. 6 (3): 300-311.

OLIVEIRA, T. F., FERREIRA, J. S., BOA SORTE, P. M. F., REIS, V. M., BALDANI, J. I., SCHWAB, S. 2009. Concentração mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento**. 49:1-16.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIGAWA, S. O., FREITAS, B. R. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 18(2): 301-307.

PANIZO, M. M., REVIÁKINA, V., MONTES, W., GONZÁLEZ, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos em agua destilada e aceite mineral. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**. 25:35-40.

Raper, K. B.; Fennel, D. I. 1977. The Genus *Aspergillus*. **Robert E. Krieger Co.** 686.

REGASINI, L. O., PIVATTO, M., SCORZONI, L., BENADUCCI, T., FUSCO-ALMEIDA, A. M., GIANNINI, M. J. S. M., BARREIRO, E. J., SIVA, D. H. S., BOLZANI, V. S. 2010. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.** 20(5): 706-711.

SATHI, Z. S.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M. A.; FARUK, A.; RASHID, M. A. 2015. Antimicrobial susceptibility assesment of compound from *Aspergillus fumigatus*. **African Journal of Biotechnology.** 14(3): 167-170.

SILVA J. C., TEIXEIRA, M. F. S. 2008. Perfil da Viabilidade Celular e Atividade Antimicrobiana de Espécies de *Penicillium* do Acervo da Coleção de Culturas DPUA. **Instituto de Ciências Biológicas**, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SILVA, J. C., FERNANDES, O. C. C., MARTINS, M. S., RODRIGUES, A. C., TEIXEIRA, M. F. S. 2010. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** 30:48-54.

SOLA, M. C., OLIVEIRA, A. P., FEISTEL, J. C., MINAFRA, C. S., REZENDE. 2012. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. Enciclopédia Biosfera, **Centro Científico Conhecer.**8(14): 1398.

SPECIAN, V., ORLANDELLI, R. C., FELBER, A. C., AZEVEDO, J. C., PAMPHILE, J. A. 2014. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde.** 16(4):345-51.

SULEIMAN, M. M., MCGAW, L. J., NAIDOO, V., ELOFF, J. N. 2010. Detection of Antimicrobial Compounds By Bioautography of Different Extracts of Leaves of Selected South African Tree Species. **Afr. J. Trad. CAM.** 7(1): 64-78.

TEIXEIRA, M. F. S., SILVA, T. A., PALHETA, R. A., CARNEIRO, A. L. B., ATAYDE, H. M. 2011. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas).** 1-255. Editora da Universidade Federal do Amazonas, Manaus.