

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS (PPGCTRA)

**Avaliação de meios e condições de cultivo de fungos
filamentosos Amazônicos em um programa de triagem de
antimicrobianos**

MONIQUE ANTUNES NEGREIROS

ITACOATIARA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS (PPGCTRA)

MONIQUE ANTUNES NEGREIROS

**Avaliação de meios e condições de cultivo de fungos
filamentosos Amazônicos em um programa de triagem de
antimicrobianos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos na área de concentração Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Maxwell Adriano Abegg

Coorientador: Prof. Dr. Ranieri Campos

ITACOATIARA

2020

Ficha Catalográfica

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

N385a Negreiros, Monique Antunes
Avaliação de meios e condições de cultivo de fungos filamentosos
Amazônicos em um programa de triagem de antimicrobianos /
Monique Antunes Negreiros . 2020
73 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maxwel Adriano Abegg
Coorientador: Ranieri Campos
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Antimicrobianos. 2. Fungos. 3. Compostos bioativos. 4. Meios
de cultivo. 5. Condições de cultivo. I. Abegg, Maxwel Adriano. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

MONIQUE ANTUNES NEGREIROS

**Avaliação de meios e condições de cultivo de fungos filamentosos
Amazônicos em um programa de triagem de antimicrobianos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos na área de concentração Ciências Ambientais.

Aprovado em 03 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maxwell Adriano Abegg, Presidente

Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Renata Takeara Hattori, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Alex Martins Ramos, Membro

Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a meus avós Maria de Nazaré e José Virgílio (in memoriam), que foram exemplos de caráter e humildade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que me permitiu chegar até aqui, que foi sustento nos dias difíceis e reconfortante nos momentos de renúncia. À Ele toda minha devoção, amor e gratidão por me permitir superar todas as adversidades que ocorreram no decorrer desta trajetória.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas por possibilitar minha instrução acadêmica. Meus agradecimentos também são direcionados aos docentes da instituição, bem como aos colegas do Laboratório de Diversidade e Motilidade Microbiana do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET. Não poderia deixar de agradecer a meu orientador Dr. Maxwell Adriano Abegg e meu coorientador Dr. Ranieri Campos por toda a paciência, apoio e confiança.

Agradeço também a Universidade Federal do Paraná - UFPR por abrir as portas para a realização de etapas importantes de nosso estudo. A missão para Curitiba foi uma experiência incrível e desafiadora ao mesmo tempo. Além disto, tive o privilégio de conhecer o professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel que foi bastante solícito e me instruiu nos procedimentos que eu desconhecia. Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, em especial aos professores Alexandre Meneguello Fuentesfria, Saulo Andrade e Priscila Dallé da Rosa por seus ensinamentos.

Agradeço aos meus amigos, familiares e namorado por compreenderem quão importante foi esta etapa para meu amadurecimento profissional e pessoal. Sabemos que foi necessário abdicar de momentos importantes dentro do âmbito familiar na esperança de um futuro melhor. Espero de agora em diante conseguir recompensar todos os momentos em que me fiz ausente, principalmente na vida de minhas irmãs (Manuela e Eduarda).

E finalmente, mas não menos importante agradeço aos meus avós que foram em vida os meus maiores incentivadores. Hoje sem eles a caminhada torna-se mais difícil, mas sei que mesmo distante ainda torcem por minha vitória. É este amor incondicional que me motiva a continuar lutando e enfrentando os desafios da vida.

RESUMO

A redescoberta de compostos bioativos é um problema nos programas de triagem de produtos naturais e a padronização das condições de cultivo que permitem a obtenção de novos ativos é fundamental em tais programas. Neste trabalho, o impacto de dois meios sólidos (arroz e aveia) e um meio líquido (caldo Czapeck) e diferentes condições de cultivo para ativos antimicrobianos foram avaliadas. Doze fungos filamentosos de ambientes Amazônicos foram utilizados. A espectrofotometria UV-Vis estimou a complexidade dos extratos produzidos. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada contra *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*. Os meios sólidos foram promissores, pois permitiram obter maior variedade de metabólitos ativos. O meio de aveia forneceu maior variedade de metabólitos ativos, mas devido à grande complexidade dos extratos obtidos, os procedimentos de separação foram consideravelmente mais complexos do que usando arroz. Tomados em conjunto, o meio de arroz e o uso de 39 dias de fermentação mostraram-se as condições de cultivo mais promissoras do que os meios líquidos normalmente empregados nos programas de triagem no Brasil. Os extratos produzidos nesta condição mostraram atividade contra pelo menos duas das bactérias testadas. O cultivo de *Penicillium maximae* (fungo isolado pela segunda vez em território brasileiro) em meio sólido produziu frações ativas contra *E. coli* em bioautografia.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Fungos. Compostos bioativos. Meios de cultivo. Condições de cultivo. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The rediscovery of bioactive compounds is a problem within natural product screening programs and the standardization of cultivation conditions that allow new actives to be obtained is critical in such programs. In this work, the impact of two solid media (rice and oats) and one liquid medium (Czapeck broth) and different cultivation conditions for antimicrobial actives were evaluated. Twelve filamentous fungi from Amazonian environments were used UV-Vis spectrophotometry estimated the complexity of the extracts produced. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated against *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus*. The solid media appeared to be more promising as they allowed to obtain a larger range of active metabolites. The oat medium provided a larger range of metabolites, but due to the great complexity of the extracts obtained, the separation procedures were considerably more complex than using rice. Taken together, the rice medium and the use of 39 days of fermentation proved to be a seemingly more promising cultivation condition than the liquid media usually employed in screening programs in Brazil. The extracts produced in this condition showed activity against at least two of the tested bacteria. The cultivation of *Penicillium maximae* (fungus isolated for the second time in Brazilian territory) in solid media yielded the production of active fractions against *E. coli* in bioautography.

Keywords: Antimicrobials. Fungus. Bioactive compounds. Cultivation media. Cultivation conditions. Secondary metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfologia de <i>Aspergillus ochraceus</i>	17
Figura 2. <i>Penicillium maximae</i> cultivado durante sete dias a 25°C.....	18
Figura 3. Estrutura química da penicilina (1), lovastatina (2) e da ciclosporina A (3).....	21
Figura 4. Visão geral dos parâmetros utilizados na abordagem OSMAC.....	23
Figura 5. Fluxograma de metodologias adotadas no estudo.....	45
Figura 6. Identificação dos fungos.....	49
Figura 7. Preservação dos fungos filamentosos do solo e anemófilos.....	50
Figura 8. Rendimento dos extratos produzidos nos cultivos sólidos de 11 e 31 dias.....	52
Figura 9. Rendimento dos extratos produzidos no mesmo substrato sólido em diferentes períodos de cultivo.....	53
Figura 10. Rendimento do caldo de 14 e 21 dias de cultivo.....	54
Figura 11. Rendimento das frações obtidas nos cultivos sólidos em 31 dias de fermentação....	55
Figura 12. Rendimento das frações obtidas dos caldos de 14 e 21 dias de cultivo.....	56
Figura 13. Comparação geral dos rendimentos obtidos em todos os cultivos de aveia.....	58
Figura 14. Atividade antimicrobiana dos extratos escalonados em DMSO 1% e 2%.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Faixas de amostras parcialmente purificadas produzidas pelos fungos IS-9 e HSUC-6.....	60
Tabela 2. Teste de atividade antimicrobiana das frações parcialmente purificadas.....	61
Tabela 3. Identificação morfológica dos 27 fungos filamentosos incorporados a coleção.....	72

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

L	Litros
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
g	Gramas
mg	Miligramas
μ g	Microgramas
cm	Centímetros
mm	Milímetros
BDA	Batata Dextrose Ágar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CC	Cromatografia em Coluna
DMSO	Dimetilsulfóxido
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria Bertani
MEA	Malt Extract Ágar
MHA	Mueller Hinton Ágar
MIC	Minimum inhibitory concentrations
MS	Metabólito Secundário
NRP	Non-Ribossomal Peptides
PKS	Polyketide Synthase
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotação por minuto

SMA	Starch Milk Ágar
TLC	Thin-layer chromatography
UV	Ultravioleta
YESD	Yeast Extract Soy peptone Ágar
%	Por cento
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Referencial teórico	15
2.1 Características Gerais dos Fungos.....	15
2.2 Fungos Filamentosos.....	15
2.2.1 <i>Aspergillus ochraceus</i>	16
2.2.2 <i>Aspergillus melleus</i>	17
2.2.3 <i>Penicillium maximae</i>	17
2.2.4 <i>Fusarium oxysporum</i>	18
2.3 Metabólitos Secundários (MS).....	19
2.3.1 <i>Policetídeos</i>	19
2.3.2 <i>Peptídeos Não-Ribossomais</i>	20
2.3.3 <i>Alcaloides</i>	20
2.4 Importância dos Compostos Bioativos.....	21
2.5 Uma Cepa Vários Compostos - One Strain Many Compounds (OSMAC).....	22
2.5.1 <i>Cultivo em Diferentes Condições de Fermentação</i>	23
2.5.2 <i>Alteração de Fontes Nutricionais</i>	24
2.5.3 <i>Co-cultivo</i>	24
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivo Específico.....	26
4. Materiais e Métodos (Artigo Submetido)	27
5. Metodologia Complementar	44
5.1 Identificação Morfológica.....	44
5.2 Métodos de Preservação.....	44
5.3 Cultivo em Escala Piloto.....	44
5.4 Extração da Cultura de Fungos.....	46
5.5 Teste de Extratos para a Atividade Antimicrobiana.....	46
5.5.1 <i>Micro-organismos teste</i>	46
5.5.2 <i>Teste de Atividade Antimicrobiana</i>	46
5.6 Cultivo Sólido em Larga Escala.....	46

5.7 Purificação Parcial dos Metabólitos Secundários.....	47
5.7.1 <i>Fracionamento dos Extratos</i>	47
5.7.2 <i>Cromatografia em Coluna</i>	47
5.7.3 <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	48
6. Resultados e Discussão Complementar	49
6.1 Identificação Morfológica dos Fungos.....	49
6.2 Viabilidade dos Fungos.....	50
6.3 Análise Individual das Condições de Cultivo em Escala Piloto.....	51
6.3.1 <i>Rendimento das Frações</i>	55
6.4 Análise Individual das Condições de Cultivo em Larga Escala.....	57
6.4.1 Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Larga Escala.....	58
6.5 Frações Parcialmente Purificadas.....	60
7. Conclusão	61
8. Referências	62
9. Anexo I	72
10. Anexo II	73

1. INTRODUÇÃO

Os compostos isolados de fontes biológicas representam a grande maioria das drogas aprovadas para uso clínico (NEWMAN; GRAGG, 2012). Aproximadamente um quarto dos compostos terapêuticos foram isolados de fungos (BÉRDY, 2012). Estes micro-organismos sintetizam compostos que podem ser a chave para a resolução de problemas emergentes em saúde pública (RAGHAVA *et al.*, 2017). Entretanto, determinadas condições de cultivo nem sempre favorecem a expressão de genes crípticos (genes silenciados em uma condição de cultivo padrão), e a redescoberta de moléculas bioativas é um problema enfrentado pelos laboratórios de produtos naturais (PAN *et al.*, 2019).

A variação de parâmetros de cultivo, abordagem frequentemente conhecida como OSMAC (*One Strain Many Compounds*) (BODE *et al.*, 2002), pode gerar impactos significativos sobre a quantidade e diversidade dos metabólitos secundários produzidos (ZUTZ *et al.*, 2016). No entanto, em um programa de triagem de antimicrobianos, no qual se deseja triar grande número de fungos filamentosos, a abordagem OSMAC nem sempre é viável, de forma que a busca de um meio e condição de cultivo que permitam a produção mais eficiente de novos antimicrobianos se torna uma necessidade (VANDERMOLEN *et al.*, 2013).

Avaliar diferentes parâmetros de fermentação como a composição do meio, a taxa de aeração, temperatura e alteração de pH pode ser igualmente um processo trabalhoso. No entanto, o emprego de condições que imponham estresse ao micro-organismo, pode favorecer a detecção e isolamento de uma gama mais diversificada de compostos bioativos, sendo a fermentação sólida mais associada a estresse metabólico dos fungos cultivados do que a fermentação em caldo (VANDERMOLEN *et al.*, 2013).

Variações nas condições de cultivo podem favorecer a ativação de rotas metabólicas silenciadas em condições de cultivo padrão, gerando impactos substanciais sobre a quantidade e diversidade da produção de metabólitos secundários de origem fúngica (ZUTZ *et al.*, 2016). Assim, neste estudo objetivou-se otimizar os meios e tempo de cultivo de forma a induzir rotas metabólicas alternativas para a obtenção de novos compostos dentro de um programa de triagem de antimicrobianos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características Gerais dos Fungos

Os fungos constituem um fascinante grupo de micro-organismos, acredita-se que existem 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais apenas 7% foram devidamente identificados (RAJAMANIKYAM *et al.*, 2017). Os fungos são classificados como seres eucariontes, pois apresentam membrana nuclear envolvendo os cromossomos e o nucléolo (GANEIO *et al.*, 2019). Como não são capazes de absorver energia luminosa, obtêm a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes e por isto são categorizados como seres heterotróficos (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). Esses micro-organismos podem existir na forma parasita ou vivendo como seres saprófitas, obtendo nutrientes por meio da decomposição da matéria orgânica e por sequestro de nutrientes de um hospedeiro (AL-FAKIH *et al.*, 2019; FENG *et al.*, 2016).

O processo de respiração dos fungos pode ocorrer de forma aeróbica ou anaeróbica facultativa, esta última favorecendo seu crescimento em condições extremas com baixas concentrações de oxigênio (VIEIRA *et al.*, 2006). Ainda, os fungos podem ser classificados com base em sua morfologia em dois tipos, os fungos leveduriformes (forma unicelular) e os fungos filamentosos (forma multicelular), sendo estes últimos mais abundantes na natureza. Existe um terceiro grupo de fungos conhecido como dimórfico, este pode se apresentar na forma leveduriforme ou filamentosa, a depender da temperatura a que é exposto (POWERS-FLETCHER *et al.*, 2016).

2.2 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são organismos multicelulares e possuem a capacidade de formar alongamentos tubulares conhecidos como hifas, que se propagam por extensão polar (ADL *et al.*, 2019). A formação das hifas é um processo crítico que se refere a capacidade dos micélios de irradiar e colonizar os substratos de crescimento. A ramificação das hifas pode ocorrer nas pontas hifais (definida como ramificação apical) ou por meio da ramificação subapical em decorrência da ramificação lateral (HARRIS, 2019). A depender do filo, as hifas podem ou não ser particionadas por meio de paredes transversais conhecidas como septos, que se caracterizam por invaginações nas paredes celulares (STEINBERG *et al.*, 2017).

O conjunto de hifas de um fungo é conhecido como micélio, o chamado tecido verdadeiro. O micélio pode se apresentar como micélio vegetativo ao assumir as funções de assimilação, fixação e crescimento, ou se diferenciar em micélio de frutificação que está diretamente relacionado com o processo de reprodução fúngica (BONFANTE *et al.*, 2019).

A medida em que os micélios são formados, surgem estruturas capazes de ser observadas a olho nu, conhecidas como colônias. As colônias são constituídas por quatro zonas concêntricas; a zona periférica (caracterizada pela presença de ramificações monopodiais, simpodiais e dicotômicas), a zona de crescimento da biomassa, zona de frutificação e a zona central (onde o crescimento fúngico cessou) (QIN *et al.*, 2016).

Para a diferenciação e identificação da maioria dos fungos filamentosos existem estruturas que são conhecidas como estruturas de frutificação (NOWROUSIAN, 2018). As estruturas de frutificação são células que compõem as hifas e que sob determinadas circunstâncias biológicas, sofrem modificação dando origem a dois tipos celulares; células esporogênicas que originam os esporos e as células conidiogênicas que dão origem aos conídios (NOWROUSIAN, 2018). A identificação das estruturas de frutificação observadas à microscopia são elementos chave para a classificação morfológica dos fungos. Embora, a investigação molecular disponha de ferramentas indispensáveis para a determinação à nível de espécie.

2.2.1 *Aspergillus ochraceus*

O gênero *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos filamentosos mais bem estudados. Os fungos deste gênero podem crescer em uma ampla gama de nichos, especialmente em solos e matéria orgânica, além de possuírem a capacidade de colonizar hospedeiros animais e plantas (DE VRIES *et al.*, 2017). O *Aspergillus ochraceus* por sua vez é frequentemente encontrado como contaminante de alimentos e bebidas em regiões tropicais, causando problemas para a saúde humana e animal por meio da produção de micotoxinas (FARBO *et al.*, 2018).

Embora o *A. ochraceus* produza compostos nocivos à saúde, eles também são considerados ricos reservatórios de compostos especialmente quando cultivados em meios sólidos (FRANK *et al.*, 2019). Também há relatos que o *A. ochraceus* isolado do solo produz metabólitos com potencial anticâncer (NADUMANE *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2018).

O *A. ochraceus* apresenta colônias de coloração branca amarelada (conforme observado na Figura 1), com textura algodonosa e diâmetro de colônia atingindo 7 cm quando cultivado em ágar batata dextrose (BDA). A microscopia de *A. ochraceus* conta com a presença de conídios globosos com diâmetro variando entre 2,5 a 3,5 μm . Ainda apresenta vesículas com característica globosa de diâmetro variando entre 35 a 50 μm e hifas do tipo septadas (DEWI, 2018).

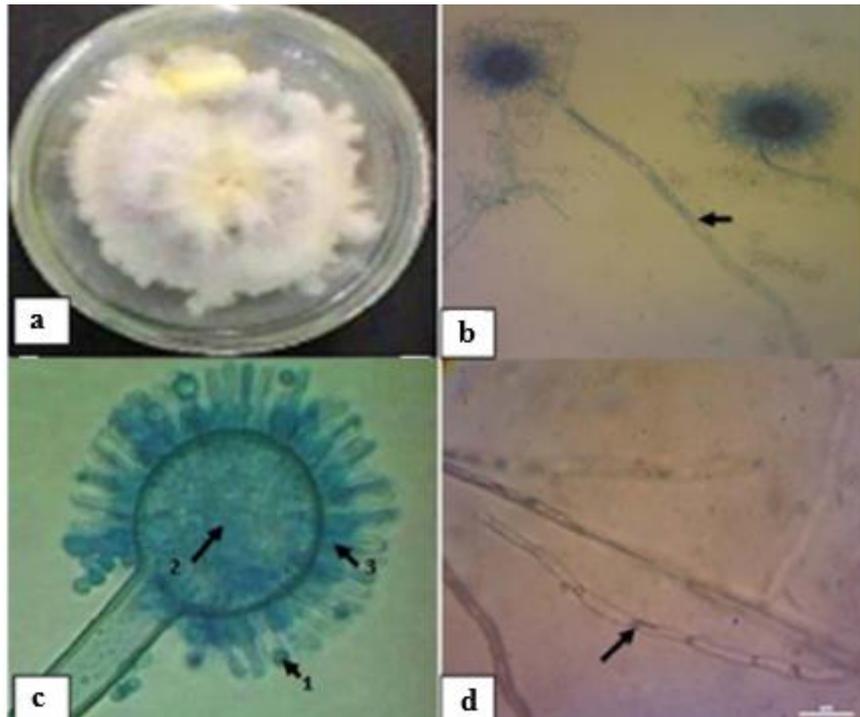


Figura 1. Morfologia de *Aspergillus ochraceus*. **a)** Colônia cultivada em BDA durante 7 dias de incubação a 25°C. **b)** Conidióforo. **c)** 1. conídeo, 2. vesícula, 3. fiálide. **d)** Hifa septada.

Fonte: Adaptado de Dewi 2018.

2.2.2 *Aspergillus melleus*

O *Aspergillus melleus* pode ser encontrado em diversos nichos, vivendo como fungo endofítico ou crescendo em diferentes tipos de solos (WANG *et al.*, 2018). A morfologia do *Aspergillus melleus* em meio Czapeck é representada pela coloração amarelo-dourada de suas colônias e micélio vegetativo branco com abundantes estruturas conidiais. O reverso da colônia varia de laranja a marrom com pigmento de coloração marrom claro. Os diâmetros das colônias variam de acordo com os meios de cultivo; Caldo Czapeck (25-50 mm) e Meio extrato de malte (30-56 mm) (ZOTTI *et al.*, 2015).

2.2.3 *Penicillium maximae*

O gênero *Penicillium* é um dos gêneros mais comumente explorados, suas espécies têm distribuição mundial crescendo em diversos nichos e hospedeiros (BARBOSA *et al.*, 2018). O *Penicillium maximae* é uma espécie recentemente isolada e ainda pouco explorada. Há relatos do isolamento deste fungo vivendo em relação simbiótica com esponjas marinhas na costa do Brasil, o fungo produz o composto Arvoredol que possui propriedades anti-biofilme e anticancerígenas (SCOPEL *et al.*, 2017).



Figura 2. *Penicillium maximae* cultivado durante sete dias a 25°C. (A-C) Colônias cultivadas em Czapeck Yeast Autolysate Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA), e Yeast Extract Sucrose Agar (YES) da esquerda para a direita (verso e anverso). (D-F) Conidióforos. (G) Conídeos.

Fonte: Adaptado de Park *et al.*, 2019.

Quanto à morfologia (Figura 2) o *P. maximae* apresenta características similares ao *P. austrosinicum* e ao *P. sclerotiorum*, diferindo dos mesmos por apresentar crescimento mais lento a 25°C e não possuir esclerócios, respectivamente. As colônias de *P. maximae* apresentam diâmetro de 35 a 40 mm quando cultivado em Czapeck por 7 dias. Além disto, apresentam conídios de coloração verde acinzentado, micélios laranja amarelado, pigmentos solúveis na cor laranja acastanhado e bordas moderadamente elevadas (PARK *et al.*, 2019).

2.2.4 *Fusarium oxysporum*

A espécie *Fusarium oxysporum* é um micro-organismo saprófita, encontrado usualmente em solo e matéria orgânica. Alguns tipos de *F. oxysporum* atacam plantações de tomate, banana, batata e por esta razão são capazes de causar doenças que afetam a população (NIRMALADEVI *et al.*, 2016). Entretanto, também são capazes de produzir compostos

bioativos com diversas propriedades biológicas quando cultivado em substrato sólido arroz, produzindo compostos com promissora atividade contra *Leishmania braziliensis* e largo potencial citotóxico contra células cancerígenas (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

A morfologia do *F. oxysporum* é caracterizada por crescimento micelial radial que varia entre 87,66 – 90,00 mm, apresentando colônias de aspecto submerso, parcialmente submerso ou compacto, de coloração branca e pigmentação de cor variável; de branco brilhante a branco pálido (GHANTE *et al.*, 2018). À análise microscópica o *F. oxysporum* é representada por microconídeos pequenos e hialinos com comprimento variando entre 5,97 a 12,26 µm. Os macroconídios são levemente arredondados, apresentam coloração hialina e seu comprimento varia entre 12,14 a 27,10 µm (BHIMANI *et al.*, 2018).

2.3 Metabólitos Secundários de Origem Fúngica

Os metabólitos secundários são definidos por propriedades bioativas que garantem a sobrevivência dos fungos e adaptação no meio ambiente (HAUTBERGUE *et al.*, 2018). São produtos naturais que geralmente apresentam baixa massa molecular e alto potencial farmacológico (MATUSZEWSKA *et al.*, 2018). Ao contrário dos metabólitos primários, que estão relacionados aos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos fungos (TAKAHASHI *et al.*, 2017). Entre as principais classes de metabólitos produzidos pelos fungos estão os policetídeos, peptídeos não ribossomais e alcaloides (BILLS; GLOER, 2016).

A produção dos metabólitos secundários pode ocorrer na fase de crescimento fúngico, no entanto, é na fase estacionária que ocorre sua maior produção. Na fase estacionária ocorre maior estresse oxidativo devido ao esgotamento de nutrientes e acúmulo de substâncias tóxicas (BHIMAMI *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários são amplamente empregados em diversos setores das atividades humanas (VAISHNAV; DEMAINE, 2010). Os produtos naturais são voltados para as indústrias alimentícias (VENKATACHALAM *et al.*, 2018), cosméticas (AGRAWAL *et al.*, 2018) e farmacêuticas com a produção de antibióticos, antifúngicos e antitumorais (FENG *et al.*, 2019; CHAGAS *et al.*, 2017).

2.3.1 Policetídeos

Os policetídeos de origem fúngica representam uma grande classe de metabólitos secundários que apresentam extensa diversidade estrutural, onde a maior parte destes compostos possui diferentes propriedades biológicas atuando como redutores das taxas de colesterol (lovastatina), antibióticos (eritromicina) e antifúngicos (anfoteririna). (PAULO *et al.*, 2019). A maioria dos policetídeos é produzida por diferentes espécies de fungos, e por esta

razão, pesquisas têm sido desenvolvidas visando a obtenção de novos compostos bioativos (DAMIANO *et al.*, 2015).

Os policetídeos são sintetizados por meio de um conjunto de enzimas denominadas “policetídeos sintases” (ou PKS, “Polyketide Synthase”). O conjunto PKS é composto por enzimas que em conjunto ou a expressão diferenciada de alguma delas pode resultar em diferentes classes de policetídeos. Entre as enzimas que fazem parte do conjunto PKS estão as: cetosintase (KS), aciltransferase (AT), proteína carregadora de grupo ácido (ACP). Cetoreductase (KR) e desidratase (DH) (PASTRE *et al.*, 2007). Nos Ascomycetos e Basidiomicetos os tipos predominantes de PKS pertencem ao tipo iterativo I. Neste sentido, as enzimas PKS estão intimamente relacionadas com a síntese de ácidos graxos (BILLS; GLOER, 2016).

2.3.2 Peptídeos Não-Ribossomais

Os peptídeos não-ribossomais (ou NRP, “Non-Ribossomal Peptides”) são uma classe de produtos naturais sintetizados em sua grande maioria por bactérias e por fungos filamentosos a partir de vias biossintéticas das quais o ribossomo não faz parte (ISHIKAWA *et al.*, 2019). Os peptídeos não-ribossomais são de importância para as indústrias farmacêuticas devido a sua ampla atividade biológica e por isto são considerados produtos naturais com grande potencial para a descoberta de novos fármacos. Os peptídeos não-ribossomais são os principais complexos enzimáticos modulares que sintetizam metabólitos secundários farmacologicamente importantes (SINGH *et al.*, 2017).

A síntese dos peptídeos não-ribossomais é essencial para compreensão dos mecanismos de atuação destes compostos e conseqüentemente da atividade biológica que desenvolvem. Entre os NRPs de maior interesse no ramo farmacêutico estão os antibióticos como a vancomicina e a daptomicina, e o imunossupressor ciclosporina A (GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

2.3.3 Alcaloides

Os alcaloides representam um extenso grupo de metabólitos secundários com baixo peso molecular e que contém em sua constituição o nitrogênio, amplamente produzidos a partir do cultivo de fungos e plantas (RASMUSSEN *et al.*, 2012). No reino Fungi, os basidiomicetos e ascomycetos são importantes produtores de compostos de interesse biotecnológico possibilitando a síntese de moléculas voláteis e de sabor, anteriormente consideradas típicas de plantas (CÓRDOBA; RÍOS, 2012).

Os alcaloides são moléculas muito importantes não apenas do ponto de vista químico, mas também por suas diversas propriedades biológicas, tais como: propriedades antifúngicas, antivirais e anticâncer (ZHANG *et al.*, 2012).

Os fungos são capazes de sintetizar diversos grupos de alcaloides, entre eles os alcaloides do ergot (AE) que são um grupo de compostos biologicamente ativos de uma classe de derivados de indol (FLOREA *et al.*, 2017). Os alcaloides do ergot podem ser produzidos principalmente pelos gêneros *Claviceps*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Aspergillus*. Os AE ocupam lugar importante nas indústrias farmacêuticas pois atualmente estão incorporados em mais de 100 medicamentos de uso clínico (DEMBITSKY, 2014).

2.4 Importância dos Compostos Bioativos

Historicamente, os fungos são conhecidos pela produção de compostos bioativos (NICOLETTI; VINALE, 2018), como o caso da penicilina (1) descoberta em 1929 por Alexander Fleming a partir da espécie *Penicillium crysogenum*. Este antibiótico revolucionou o tratamento de doenças infecciosas principalmente no período da Segunda Guerra Mundial (BERNARDINI *et al.*, 2018). Desta forma, os fungos filamentosos representam um importante grupo de micro-organismos responsáveis pela síntese de uma gama de moléculas bioativas que podem proporcionar muitos benefícios para a saúde humana e animal (PEYRAT *et al.*, 2019).

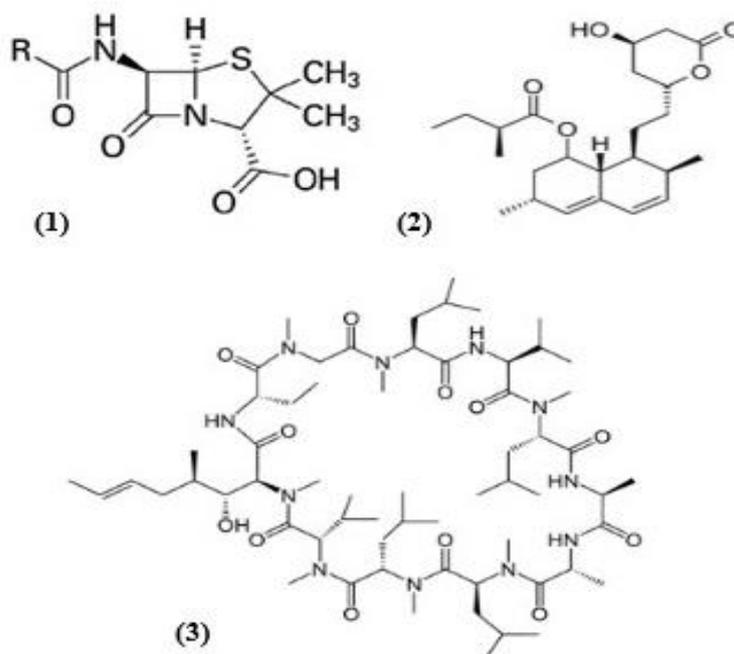


Figura 3. Estrutura química da penicilina (1), lovastatina (2) e da ciclosporina A (3).

Fonte: Adaptado de Takahashi *et al.* 2017 e Askenazi *et al.* 2003.

Atualmente, muitas substâncias produzidas a partir do metabolismo fúngico apresentam diversas propriedades biológicas, como a lovastatina (2) que é um importante hipocolesterêmico (JAMIL *et al.*, 2018), a ciclosporina A (3) fundamental na área médica atuando na redução da rejeição de órgãos transplantados (FLORES *et al.*, 2019).

Atualmente, uma das grandes problemáticas enfrentadas dentro dos programas de produtos naturais é a redescoberta de compostos bioativos (VANDERMOLEN *et al.*, 2013). Isto porque a diversidade químico-genética dos fungos ainda seja inexplorada em sua totalidade. Neste sentido, algumas técnicas vêm sendo empregadas de modo a maximizar a produção dos metabólitos secundários fúngicos, visando explorar o metaboloma fúngico, entre estas técnicas se destaca a abordagem OSMAC.

2.5 Uma Cepa Vários Compostos - One Strain Many Compounds (OSMAC)

Os fungos possuem importante papel na síntese de metabólitos secundários de importância médica, pois são capazes de produzir compostos com potencial antibacteriano, antifúngico e antibiofilme (THAWABTEH *et al.*, 2019). Entretanto, dados de sequenciamento genômico revelaram uma inconsistência entre o número de agrupamentos de genes biossintéticos codificadores de metabólitos secundários e o real número de compostos produzidos por estes micro-organismos (ROMANO *et al.*, 2018).

Isto ocorre porque muitos genes biossintéticos estão silenciados sob determinadas condições laboratoriais, inviabilizando a expressão de metabólitos secundários bioativos (FAN *et al.*, 2019). Desta forma, encontrar alternativas capazes de induzir a expressão destes genes crípticos (silenciados), poderia favorecer a expansão da diversidade metabolômica, permitindo a descoberta de novos compostos (YING *et al.*, 2018).

Atualmente, técnicas de cultivo vêm sendo desenvolvidas para estimular a expressão de genes crípticos por meio da alteração de padrões de fermentação. A abordagem OSMAC vem sendo amplamente empregada como uma alternativa para maximizar a produção de metabólitos secundários (LI *et al.*, 2019). Nesta perspectiva, analisa-se como uma única cepa pode se comportar sob diferentes condições de fermentação. Os princípios da narrativa OSMAC estão relacionados com o conceito “uma cepa vários compostos” (do inglês: “one strain many compounds”) (ZHANG *et al.*, 2018).

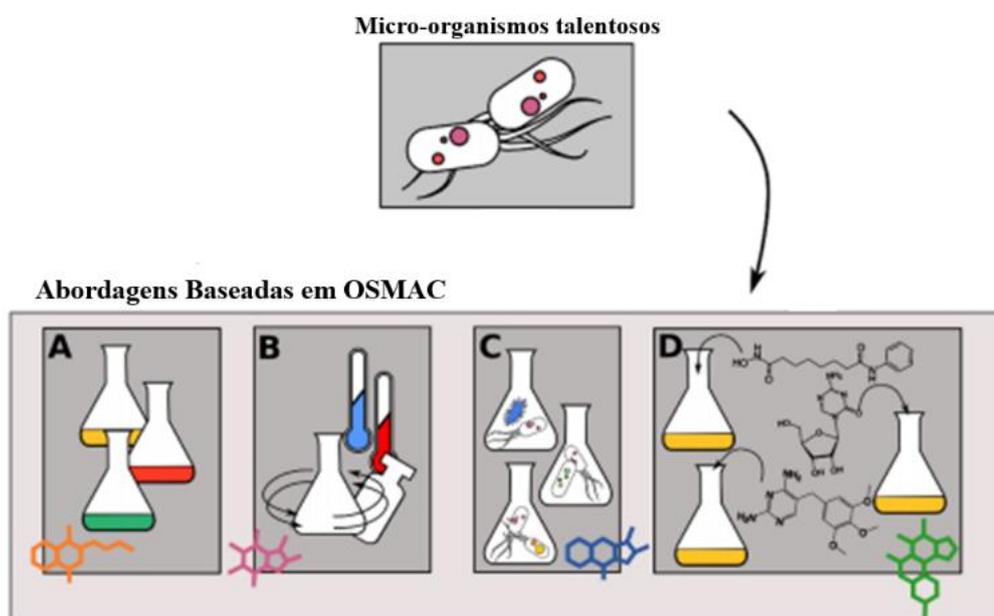


Figura 4. Visão geral dos parâmetros utilizados na abordagem OSMAC. **A:** Regime de nutrientes; **B:** Parâmetros físicos; **C:** Co-cultivo; **D:** Elictores químicos.

Fonte: adaptado de Romano *et al.* *Marine Drugs*. 16:244, 2018.

Em OSMAC alguns parâmetros do processo fermentativo são modificados como; pH, temperatura de cultivo, cultivo em diferentes condições de fermentação (sólidas e líquidas), alterações nas fontes nutricionais (carbono, nitrogênio, sais), condições de aeração da cultura de fermentação, uso de elicitores químicos e co-cultivo (ROMANO *et al.*, 2018).

Entre os parâmetros usualmente mais utilizados dentro da perspectiva OSMAC encontra-se: a alteração das condições de fermentação (cultivos sólidos e líquidos), alteração das principais fontes nutricionais e o Co-cultivo.

2.5.1 Cultivo em Diferentes Condições de Fermentação

Entre os parâmetros de cultivo avaliados na perspectiva OSMAC o meio de cultura tem efeito real sobre a expressão gênica e a produção de uma variedade de metabólitos secundários (LI *et al.*, 2016). As diferenças entre as culturas sólidas e líquidas tem efeitos reais na quimiodiversidade dos compostos bioativos (VANDERMOLEN *et al.*, 2013). Isto foi massivamente observado em estudos de fungos filamentosos cultivados em condições sólidas e líquidas de fermentação, os cultivos sólidos renderam maior variabilidade de compostos comparados as culturas líquidas (ÖZKAYA *et al.*, 2018).

Em uma abordagem avaliando o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos do gênero *Aspergillus* sp. cultivados nos substratos sólidos arroz e milho, foram produzidas substâncias com propriedades antibacteriano e antifúngicas (CHAGAS *et al.*, 2017). Assim também foi observado no cultivo de *Aspergillus carneus* em substrato sólido arroz, que resultou na produção de compostos bioativos que não foram sintetizados quando o mesmo fungo foi cultivado em caldo (ÖZKAYA *et al.*, 2018).

2.5.2 Alteração de Fontes Nutricionais

As fontes de carbono e nitrogênio são essenciais em um ambiente de cultivo, porque exercem controle sobre a expressão gênica dos metabólitos secundários (FAIT *et al.*, 2011). O carbono fornece a base para a construção da biomassa fúngica e garante uma fonte de energia para os seres heterotróficos, além disso fornecem unidades de carbono para a produção de metabólitos secundários (BANERJEE *et al.*, 2016). O nitrogênio é necessário para a produção de proteínas e ácidos nucleicos (ROMANO *et al.*, 2018).

A diminuição, alteração ou ausência destes nutrientes pode gerar estresse no ambiente de cultivo e induzir o micro-organismo a encontrar uma nova rota metabólica para sobreviver a esta condição de fermentação (PAN *et al.*, 2019). O estresse no ambiente de cultivo favorece a exploração de rotas alternativas para a produção de compostos bioativos (YADAV, 2019). A modificação das fontes de carbono tem sido exaustivamente investigada e apresentou efeitos variáveis na produção de antitumorais, antibacterianos e antifúngicos (KAWAKAMI *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2018; PANDEY *et al.*, 2018).

2.5.3 Co-cultivo

Uma das técnicas promissoras para expandir a variedade metabólica dos fungos é a realização do co-cultivo. Isto porque esta abordagem engloba a interação de micro-organismos antagônicos em um mesmo substrato gerando competição no ambiente de fermentação (BORUTA *et al.*, 2019). Estudos indicam que a metodologia do co-cultivo pode ser eficaz para o isolamento de uma gama diversificada de compostos em um programa de produtos naturais (TOM *et al.*, 2019; MOUSSA *et al.*, 2019). Na literatura se tem relatos que o co-cultivo de fungos filamentosos pode resultar na produção de compostos com largo espectro de ação, compostos estes com propriedades antifúngicas e antibacterianas que foram produzidos somente em um ambiente de co-cultivo (PAN *et al.*, 2019).

Considerando as modificações nos parâmetros de cultivo observadas na perspectiva OSMAC, acredita-se que simples alterações no ambiente de fermentação podem ter efeitos significativos na produção de metabólitos secundários bioativos (HANDA *et al.*, 2019). Além disto, a ferramenta OSMAC é relativamente barata e acessível, podendo ser uma alternativa para explorar a produção de novas moléculas bioativas (VANDERMOLEN *et al.*, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as diferentes condições de fermentação de fungos filamentosos isolados do ambiente Amazônico dentro de um programa de triagem de antimicrobianos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar isolados filamentosos de amostras do ambiente Amazônico;
- Avaliar a produtividade de metabólitos fúngicos sob diferentes condições de cultivo;
- Investigar o potencial antimicrobiano dos metabólitos produzidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Artigo Submetido à Revista The Open Microbiology Journal

TÍTULO:

Evaluation of culture conditions and media of Amazonian filamentous fungi in an antimicrobial screening program

Monique Antunes Negreiros¹; Milthes Viana Guedes²; Thaís Karoline de Souza Rodrigues¹; Beatriz Rebelo Rodrigues²; Andria Lopes Cruz²; Priscila Dallé da Rosa³; Saulo Fernandes de Andrade³; Alexandre Meneghello Fuentefria³; Obdúlio Gomes Miguel⁴; Ranieri Campos^{1,4}; Maxwel Adriano Abegg¹.

Data de submissão: 29/01/2020

Evaluation of culture conditions and media of Amazonian filamentous fungi in an antimicrobial screening program

* Monique Antunes Negreiros¹; Milthes Viana Guedes²; Thaís Karoline de Souza Rodrigues¹; Beatriz Rebelo Rodrigues²; Andria Lopes Cruz²; Priscila Dallé da Rosa³; Saulo Fernandes de Andrade³; Alexandre Meneghello Fuentefria³; Obdúlio Gomes Miguel⁴; Ranieri Campos^{1,4}; Maxwell Adriano Abegg¹.

¹Postgraduate Program in Science and Technology for Amazon Resources, Federal University of Amazonas, Itacoatiara, AM, Brazil.

²Pharmacy Course, Institute of Exact Sciences and Technology, Federal University of Amazonas, Itacoatiara, AM, Brazil.

³Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brazil.

* corresponding author: moniqueantunes39@gmail.com; R; 3863; Tiradentes; Itacoatiara; Nossa Senhora do Rosário Street, AM; (92) 99344-8557.

Abstract

The rediscovery of bioactive compounds is a problem within natural product screening programs and the standardization of cultivation conditions that allow new actives to be obtained is critical in such programs. In this work, the impact of two solid media (rice and oats) and one liquid medium (Czapeck broth) and different cultivation conditions for antimicrobial actives were evaluated. Twelve filamentous fungi from Amazonian environments were used UV-Vis spectrophotometry estimated the complexity of the extracts produced. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated against *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus*. The solid media appeared to be more promising as they allowed to obtain a larger range of active metabolites. The oat medium provided a larger range of metabolites, but due to the great complexity of the extracts obtained, the separation procedures were considerably more complex than using rice. Taken together, the rice medium and the use of 39 days of fermentation proved to be a seemingly more promising cultivation condition than the liquid media usually employed in screening programs in Brazil. The extracts produced in this condition showed activity against at least two of the tested bacteria. The cultivation of *Penicillium maximae* (fungus isolated for the second time in Brazilian territory) in solid media yielded the production of active fractions against *E. coli* in bioautography.

Keywords: Antimicrobials. Fungus. Bioactive compounds. Cultivation media. Cultivation conditions. Secondary metabolites.

1. INTRODUCTION

Compounds isolated from biological sources represent the vast majority of drugs approved for clinical use [1]. Approximately one quarter of the therapeutic compounds were isolated from fungi [2]. These microorganisms synthesize compounds that may be the key to solve emerging public health problems [3]. However, certain cultivation conditions do not always favor the expression of cryptic genes [4] (genes silenced under a standard cultivation condition), and the rediscovery of bioactive molecules is a problem faced by natural product laboratories.

Variation of cultivation parameters, an approach often known as OSMAC (One Strain Many Compounds) [5], may have significant impacts on the quantity and diversity of secondary metabolites produced [6]. However, in an antimicrobial screening program in which a large number of filamentous fungi are to be screened, the OSMAC approach is not always viable, so the pursuit of a culture medium and condition that will allow more efficient production of new antimicrobials becomes necessity [7].

Evaluating different fermentation parameters such as medium composition, aeration rate, temperature and pH change can also be a laborious process, so in this study we chose to analyze the impact of modifications on two critical parameters in the process: the culture media and the fermentation time. Furthermore, the use of conditions that impose stress on the microorganism may favor the detection and isolation of a more diverse range of bioactive compounds, with solid fermentation being more associated with metabolic stress of cultivated fungi than fermentation in broth [7].

Thus, this study aimed to optimize the culture media and time in order to induce alternative metabolic pathways to obtain new compounds within an antimicrobial screening program.

2. MATERIALS AND METHODS

The study was carried out with 12 filamentous fungi, 6 fungi isolated from different types of Amazonian soil (unpublished data) and 6 air isolates (anemophiles) in a previous study [8]. These fungi were pre-selected through preliminary antimicrobial activity results (data not shown). Soil fungi were obtained by the use of two selective media with the intention of isolating low abundance microorganisms: HSUC and starch milk agar, according to Du et al. [9].

2.1 Identification of Filamentous Fungi

The 12 fungi were identified by morphological techniques (macro and microscopic) [10]. Of these 12, 5 isolates with marked antimicrobial potential were identified by sequencing the internal transcribed spacer in the ITS regions (ITS1- 5.8S-ITS2 of the rDNA gene), according to the protocol of Tonial et al. [11], the sequences being compared using the GenBank platform.

2.2 Pilot Scale Cultivation

The 12 pre-selected filamentous fungi were grown on a pilot scale under two fermentation conditions, solid (rice and oats) and liquid (Czapeck broth). The media were prepared according to VanderMolen et al. [7].

2.2.1 Cultivation in Solid Medium

The fungi were grown on 2% malt extract agar at 28°C for ten days. Ten plugs (7 mm) from the culture plates were transferred to 15 mL of YESD broth (20 g soy peptone, 20 g dextrose, 5 g yeast extract, 1 L H₂O) and this broth was incubated for 5 days with shaking orbit at 110 rpm and room temperature. The pre-fermentation broth containing the mycelial mass was poured onto the solid media (rice and oats), which were cultivated under static condition for 11 and 31 days. To obtain the extracts, 50 mL of methanol was added to each culture, the material was macerated and submitted to orbital agitation at 100 rpm for 24 hours. The cultures were filtered, the mycelia being discarded, and the extracts concentrated in rotary evaporator [7].

2.2.2 Liquid Culture

The fungi were grown on 2% malt extract agar at 28°C for 28 days. Ten plugs (7 mm) were transferred to 250 ml Czapeck broth. The cultures were fermented under orbital agitation at 100 rpm for 14 and 21 days at room temperature. To obtain crude extracts, 250 mL of methanol were added to the liquid cultures. Extraction occurred under orbital agitation at 100 rpm for 24 hours and the extracts were concentrated by rotary evaporator.

2.3 Antimicrobial Activity of Crude Extracts

2.3.1 Test Microorganisms

The target bacteria were: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. (laboratory strain) and *Staphylococcus aureus* INCQS 0324. The strains were stored in a freezer at -20°C in Luria Bertani broth (LB) (g / L composition: 29 hydrolyzed enzymatic casein 10.0g, yeast extract 5.0g, sodium chloride 10.0g, pH: 7.5 ± 0.2) added with 20% glycerol.

2.3.2 Antimicrobial Activity Test

Dry methanolic extracts were resuspended (200 mg / mL) in sterile distilled water and tested for antimicrobial activity by the Spot technique [12]. Standard suspensions of the target bacteria were produced, OD_{600nm} = 0.02 for *E. coli* and *Salmonella* sp. and 0.05 for *Staphylococcus aureus*. The suspensions were homogeneously distributed on the surface of 90 mm Mueller Hinton (MHA) agar plates, pending on the drying of the agar surface in a biological safety cabinet. Subsequently, 10 µL of crude extracts were pipetted at three equidistant points per plate. The test was performed in triplicate and sterile distilled water was used as negative control. Results were interpreted based on the measurement of inhibition halos after 24 hours of incubation at 37°C.

2.4 Breakdown of Active Extracts

The raw extracts produced in pilot scale were partitioned liquid-liquid, repeating the extraction process three times for each solvent. Solvents in increasing order of polarity (Hexane C₆H₁₄, Chloroform CHCl₃ and Ethyl Acetate C₄H₈O₂) were used in a 1:1 (v/v) ratio [13]. Four fractions were generated: Hexane Fraction (FH), Chloroform Fraction (FC), Ethyl Acetate Fraction (FA) and Remnant Fraction (FR). The obtained fractions were evaporated and their masses determined. Fraction yield was calculated in grams and fractions were tested for antimicrobial activity by the agar diffusion method [14].

2.5 Analysis of the Remaining Fraction Complexity

Scanning analyses were performed on a UV-Vis Spectrophotometer (Gold Spectrum Lab-UV-5200) ($\lambda=250-600\text{nm}$) as a preliminary analysis of the complexity of the Remaining Fractions obtained on a pilot scale. Data were processed in Origin Software 2017 (Originlab).

2.6 Large Scale Solid Fermentation

Ten filamentous fungi were grown on 2% malt extract agar (2% MEA) for ten days. Twenty plugs (7 mm) from the cultures were transferred to 30 mL of YESD broth. Pre-fermentation broths were grown under orbital agitation at 100 rpm for five days at room temperature. The pre-fermented material was transferred to 2 L flasks containing oat solid medium (400 g oats and 300 mL distilled water). This medium was chosen because of a seemingly larger range of metabolites generated at the pilot scale.

The solid medium was then homogenized by maceration and cultivation followed for 39 days in static condition and room temperature. For extraction, 1.5 L of methanol was added to each flask and extraction occurred for 12 hours under orbital agitation at 120 rpm. To confirm the antimicrobial activity of the culture in large-scale the extracts were subjected to Spot activity testing [12].

2.7 Partial Purification of Active Compounds

Two large-scale cultivation extracts (HSUC-6 and IS-9) were subjected to purification by Merck®60 Column Chromatography (CC) 0.063-0.200 mm. The ethyl acetate fraction (IS-9) and the remaining fraction (HSUC-6) were treated with the chloroform:methanol and ethyl acetate:methanol systems, respectively, in 100 mL portions, with a 10% increment of methanol in each eluted portion [15]. Individually collected fractions from the column were analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) using standard silica-coated chromatographic plates (Merck®) [16]. The fractions were applied to the chromatoplates, eluted in chloroform:ethyl acetate (2:8) and observed in UV light chamber ($\lambda=250\text{ nm}$ and 350 nm). From the isolated bands Rf (Retention Factor) values were calculated and fractions with similar band patterns were pooled.

2.8 Fraction Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of semi-purified fractions was evaluated by bioautography technique [17]. The fractions were chromatographed on chromatographic plates (Merck®) with chloroform: ethyl acetate (2:8; v/v) elution system. The plates were dried to full evaporation of the solvents and analyzed in a UV light chamber ($\lambda=300\text{ nm}$) to determine the Rf values. Suspensions of the target microorganisms (OD_{600nm} 0.02 for *E. coli* and *Salmonella* sp. and 0.05 for *S. aureus*) were homogeneously distributed and dried on the surface of MHA plates. The eluted chromatoplates were applied upside down on the inoculated surface and kept in contact with the target bacteria for 3 hours. Then the chromatoplates were removed and the plates incubated for 24 hours at 37°C. The results were interpreted based on the observation of inhibition halos in the previously observed bands.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the fractions of interest was determined by 96 well plate microdilution assay [18]. The *E. coli* test strain was grown at 37°C overnight and a suspension adjusted to OD_{600nm} = 0.02. Semi-purified fractions were resuspended in 10% DMSO and tested at concentrations of 500 to 3.9 $\mu\text{g/mL}$. Inhibitory activity was evidenced with the aid of the rezasurine

colorimetric indicator (0.01%).

2.9 Statistical Analysis

Analyses were performed using Biostat (AnalystSoft) software using one-way ANOVA and Tukey's test. Data were considered significantly different when $p < 0.05$. Pearson's coefficient (ρ) was used to calculate the correlation between the evaluated data.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Identification of Filamentous Fungi

The 12 fungi were categorized into four genera: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp. (table 1). Marked active fungi in preliminary studies were identified at molecular level as representative of the species: *Penicillium maximae*, *Penicillium rolsii*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus* and *Fusarium oxysporum* (Table 1).

In the literature, there are reports that the mentioned species have antimicrobial potential [19; 20], antifungal [21] and anticancer [22; 20]. However, *P. maximae* deserves attention because it is a recently isolated and still little explored species. *P. maximae* was isolated in Brazil by Scopel et al. [20] from marine sponges, producing a compound called arvoredol, which has anti-biofilm properties against *Staphylococcus epidermidis* and active against colorectal carcinoma cells. However, there are no reports of isolation of soil samples in Brazil.

3.2 Pilot Scale Fermentation

Considering the potential of filamentous fungi as antimicrobial suppliers [23], filamentous fungi isolated from the Amazonian environment were cultivated under different conditions in order to evaluate the most appropriate culture media and time for an antimicrobial screening program. The isolates were fermented in two distinct periods for antimicrobial potential determination and the choice of the evaluated nutritional conditions was based on the search for the expression of little explored metabolic pathways under normal fermentation conditions [23]. This is because substantial changes in these conditions can promote real effects on the final metabolic profile [24]. The rotation scheme adopted in submerged media and pre-inoculum of solid media (pre-fermentation in YESD broth) was determined by the need for multiplication of the mycelial mass produced in each fermented group.

Regarding the yields obtained within each cultivation group (Fig. 1A), it was observed that the dry masses produced comparing the solid media (rice and oats) did not present significant differences between the two evaluated periods (11 and 31 days). However, individually analyzed, some isolates increased the extract biomass in the 31-day oat substrate, when compared to the mass produced by the same fungus cultivated in rice. This increase in biomass occurred especially for TPP1.1, 8.4, 2.5 and 8.2 fungi grown on oat substrate during the 31 days of fermentation (data not shown).

Comparing the yield obtained in the solid cultivation rice (11 and 31 days) and Czapeck broth (14 and 21 days) (Fig. 1B), it was observed that there was no significant difference in relation to the masses produced ($p=0.3432$). However, individually analyzed, it was observed that the fungi 8.4, 8.2, TPP1.1, HSUC-6, 8.5 and 7.4 produced higher biomass of extracts when compared to the liquid culture (data not shown).

Table 1. Identification of filamentous fungi incorporated into the collection according to source and isolation medium.

Code	Collection Source	Isolation Substrate	Strain Identification*	Accession Number
HSUC-6	Soil	HSUC	<i>Penicillium maximae</i> *	MN782328
IS-9	Soil	SMA	<i>Fusarium oxysporum</i> *	MN782327
IS-6	Soil	SMA	<i>Aspergillus</i> sp.	-
IS-7	Soil	SMA	<i>Aspergillus</i> sp.	-
TPP1.1	Soil	SMA	<i>Aspergillus</i> sp.	-
TPP1.2	Soil	SMA	<i>Aspergillus</i> sp.	-
IS-13	Soil	SMA	<i>Aspergillus</i> sp.	-
2.5	Air	LB	<i>Aspergillus</i> sp.	-
8.5	Air	LB	<i>Curvularia</i> sp.	-
7.3	Air	LB	<i>Aspergillus ochraceus</i> *	MN782329
7.4	Air	LB	<i>Aspergillus melleus</i> *	MN782331
8.2	Air	LB	<i>Fusarium</i> sp.	-
8.4	Air	LB	<i>Penicillium rolfsii</i> *	MN782330

NOTE: Selective means used for insulation: HSUC; SMA = Starch Milk Agar; LB = Luria Bertani.

Molecular identification was performed only on the fungi indicated with “*”.

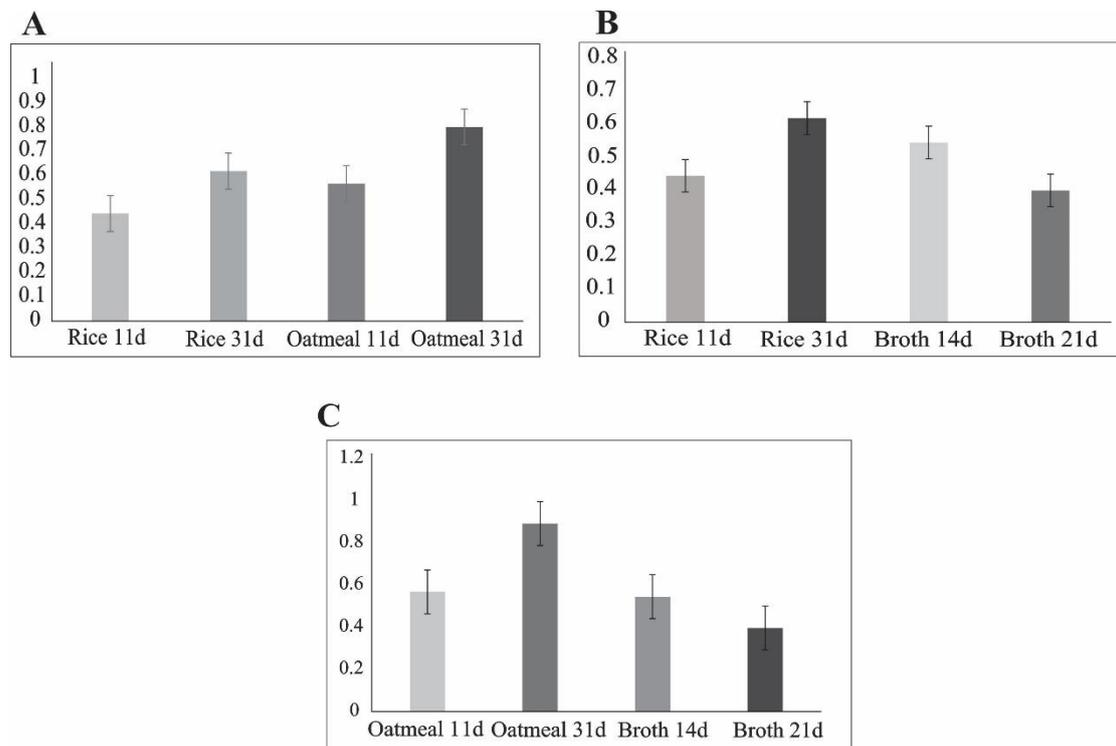


Fig. (1). Comparison of yield of crude extracts produced in pilot scale. Fig. 1A: Yield of crude extracts produced in rice and oat cultures at 11 and 31 days of fermentation; Fig. 1B: Yield of crude extracts produced in oat (11 and 31 days of fermentation) and broth (14 and 21 days of fermentation) cultures; Fig. 1C: Yield of crude extracts produced in rice (11 and 31 days of fermentation) and broth (14 and 21 days of fermentation) cultures.

There were no differences in yields comparing solid oat media (11 days) and liquid media (14 days) of fermentation ($p=0.1267$). However, the 31-day cultivation on oat substrate produced a significantly higher mass than the 21-day broth cultivation ($p=0.0422$) (Fig. 1C), which was also observed by VanderMolen et al. [7] where cultures grown in solid media (especially oat cultivation) produced extracts with masses one to two orders of magnitude larger than the same fungus grown in liquid media.

3.3 Antimicrobial Activity of Raw Extracts

The antimicrobial potential of extracts produced in different cultures was evaluated. In each growing condition, moderate activity was observed against one or more strains tested. In particular, solid media extracts were active against Gram-negative *E. coli* bacteria, with inhibition halos up to 15 mm in diameter (Table 2).

In this study, eight strains of the genus *Aspergillus* sp. (IS-6, TPP1.1, TPP1.2, IS-13, 7.4, 7.3, 2.5 and IS-7) produced extracts with antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* in at least one of the evaluated solid media. In another study, it was observed that the cultivation of fungi of the genus *Aspergillus* sp. in solid rice medium, for example, generates extracts with antimicrobial potential against *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* and *Malassezia furfur* [25]. Indeed, solid fermentation allows the production of a range of bioactive compounds [26] such as fusarialin produced by *Fusarium* sp., With inhibitory activity against *S. aureus* in rice, in the study by Tchoukoua et al. [27].

Table 2. Antimicrobial activity of crude extracts produced under different fermentation conditions.

Fungus	Substrate	Crude Extract	Test microorganisms		
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Rice	31 days	-	-	+
IS-6	Oatmeal	31 days	+	-	+
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- ++	- -	- -
	Rice	31 days	++	++	+
HSUC-6	Oatmeal	31 days	++	++	++
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- ++	- ++	- -
	Rice	31 days	+	+	+
TPP1.1	Oatmeal	31 days	++	++	++
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- +	- +	- +
	Rice	31 days	+	+	+
TPP1.2	Oatmeal	31 days	+	+	+
	Czapeck Broth	14 days 21 days	++ ++	++ ++	++ ++
	Rice	31 days	+	-	-
IS-13	Oatmeal	31 days	++	++	++
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- ++	- ++	- +
	Rice	31 days	++	++	+
7.4	Oatmeal	31 days	++	+	++

	Czapeck Broth	14 days 21 days	- ++	- ++	- +
	Rice	31 days	+	+	++
8.2	Oatmeal	31 days	-	+	+
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- -	- +	- -
	Rice	31 days	++	++	++
7.3	Oatmeal	31 days	++	++	+
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- -	- -	- -
	Rice	31 days	++	++	+
2.5	Oatmeal	31 days	+	-	+
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- -	- -	- -
	Rice	31 days	+	-	+
8.5	Oatmeal	31 days	+	+	++
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- -	- -	- +
	Rice	31 days	++	++	+
8.4	Oatmeal	31 days	+	-	+
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- -	- -	- -
	Rice	31 days	-	-	++
IS-7	Oatmeal	31 days	+	++	+
	Czapeck Broth	14 days 21 days	- ++	- +	- -
Negative control			-	-	-

NOTE: Inhibition halo diameter in millimeters (mm), reported here as: (-), no inhibition effect detected; (+), zone of inhibition between 7 ~ 9mm (weak inhibition); (++) between 10 ~ 15mm (moderate inhibitory effect) (+++) between 15 ~ 20mm (strong inhibitory effect).

Currently, solid cultures have been used in the literature as an alternative for the exploitation of fungal metabolic chemodiversity. This is because these nutritional sources may favor the production of compounds that are sometimes not biosynthesized in standard liquid medium cultures [28]. Compared to liquid cultures, solid cultures produce greater diversity of compounds with antimicrobial and antifungal potential [29, 30, 31, 32].

The antimicrobial potential of extracts produced in solid media compared to extracts produced in broth is relatively attractive. In particular, the extract produced in oat cultivation by the fungus *P. maximae* (HSUC-6) was active against all strains tested, with inhibition halos ranging from 7-15 mm in diameter. In contrast, the same broth fungus did not produce potentially active extracts in the shortest fermentation periods (14 days). At 21 days of fermentation, the extracts were active against *E. coli* and *Salmonella* sp. with inhibition halos up to 15 mm.

In the first fermentation periods in broth (14 days) only the fungus TPP1.2 produced extracts with antimicrobial activity. However, the longer broth cultivation period (21 days) allowed a larger portion of the cultivated fungi to produce active compounds (Table 2).

3.4 Antimicrobial Activity of Fractions

Methanolic crude extracts that showed antimicrobial activity were partitioned and fractional yields were analyzed indicating how much of the crude extract solubilized in the different solvents. Also, the degree of polarity of the extracts with antimicrobial potential was evidenced, according to table 3. Among the four fractions evaluated for antimicrobial activity in rice cultivation, only the remaining fractions were active, in this case against *E. coli* and *S. aureus*. When tested the same fractions against *Salmonella* sp., the remaining fraction showed the highest antimicrobial potential.

Oat cultivation fractions, when tested against *E. coli*, showed that most of the antimicrobial activity occurred in the Remnant fraction ($p=0.001175$), with inhibition halos between 7-11 mm in diameter. Among the fractions obtained from oat cultivation tested against *Salmonella* sp., there was a prevalence of antimicrobial activity of the remaining fraction in relation to the other fractions tested ($p=0.0004619$). In addition, the remaining fractions obtained from oat cultivation were also active against *S. aureus* (Table 3).

The fractions obtained from broth cultures (14 and 21 days) were active in all fractions tested, with no prevalence of antimicrobial activity for a particular fraction. Moreover, when evaluating the yield of the fractions obtained from the broth cultivation, for the lower polarity fractions the yield was lower than for the higher polarity fractions when compared to the results with solid cultivation, suggesting that in the broth fermentation there was a lower production of nonpolar compounds.

In contrast, in oat cultivation, larger amounts of nonpolar compounds were produced when compared to broth cultivars, whereas the hexane fraction, although not showing antimicrobial activity, had significantly higher yield ($p=0.0132$) when compared to the others fractions (data not shown). This was also observed in the study by VanderMolen et al. [7], where the authors mention that, after degreasing solid extracts from oat cultivation, there was a reduction in total dry mass, since hexane washing eliminated some common and unwanted metabolites (e.g. fatty acids). Thus, although the yield obtained in oat cultivation is relatively higher than that produced in broth cultivation, part of this mass is represented by (undesirable) nonpolar compounds, suggesting the need for refinement in the purification processes of the compounds of interest [7].

Table 3. Antimicrobial activity of fractions obtained from different cultures.

Code	Collection Source	Strain Identification	Antimicrobial activity (active fractions)		
			<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i>
HSUC-6	Soil	<i>Penicillium maximae</i> *	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}
			Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}
			C21 ^{Hex/Chlo/Act/Rem}	C21 ^{Rem}	C21 ^{Hex/Chlo/Act/Rem}
IS-6	Soil	<i>Aspergillus</i> sp.	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}	-
			Oat ^{Hex/Chlo/Act/Rem}	Oat ^{Rem}	-
IS-7	Soil	<i>Aspergillus</i> sp.	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}

			Oat ^{Rem}	Oat ^{Hex/Chlo/Act}	-
			-	C21 ^{Rem}	-
TPP1.1	Soil	<i>Aspergillus</i> sp.	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}
			Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}
			C21 ^{Chlo/Act}	C21 ^{Hex/Chlo/Act/Rem}	-
TPP1.2	Soil	<i>Aspergillus</i> sp.	C14 ^{Rem}	C14 Hex/Chlo/Act/Rem	Ric ^{Rem}
			C21 ^{Act}	C21 ^{Rem}	C14 ^{Rem}
			-	-	C21 ^{Rem}
IS-13	Soil	<i>Aspergillus</i> sp.	Ric ^{Rem}	Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}
			Oat ^{Rem}	C21 ^{Rem}	C21 ^{Rem}
			C21 ^{Rem}	-	-
2.5	Air	<i>Aspergillus</i> sp.	Ric ^{Rem}	Oat ^{Rem}	Ric ^{Rem}
			Oat ^{Rem}	-	Oat ^{Rem}
8.5	Air	<i>Curvularia</i> sp.	Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}
			-	C21 ^{Act/Rem}	C21 ^{Rem}
7.3	Air	<i>Aspergillus ochraceus</i> *	Ric ^{Rem}	Oat ^{Rem}	Ric ^{Rem}
			Oat ^{Hex/Chlo/Rem}	-	Oat ^{Rem}
7.4	Air	<i>Aspergillus melleus</i> *	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}	Ric ^{Rem}
			Oat ^{Hex/Rem}	Oat ^{Rem}	-
			-	C21 ^{Hex/Chlo/Act/Rem}	-
8.2	Air	<i>Fusarium</i> sp.	-	C21 ^{Act/Rem}	Oat ^{Rem}
8.4	Air	<i>Penicillium rofsii</i> *	Ric ^{Rem}	Ric ^{He/Chlo/Act/Rem}	Oat ^{Rem}
			Oat ^{Rem}	Oat ^{Rem}	C21 ^{Hex/Chlo}
			C21 ^{Hex/Chlo/Act}	C21 ^{Chlo/Act}	-

NOTE: Cultivation substrates and their active fractions are indicated by acronyms: * Ric = Rice solid substrate; * Oat = Oat solid substrate; * C14 and C21 = 14 and 21 day Czapeck Dox Broth; * Hex = Fraction hexane; * Chlo = Chloroform fraction; Act = Fraction of ethyl acetate; * Rem = Remaining Fraction.

3.5 Complexity of Pilot Scale Fractions

The remaining fractions obtained from the pilot culture (rice, oats and Czapeck broth) were analyzed by UV-Vis absorbance spectrophotometer and showed differences regarding the complexity of the extracts produced between different cultures (Figure 2).

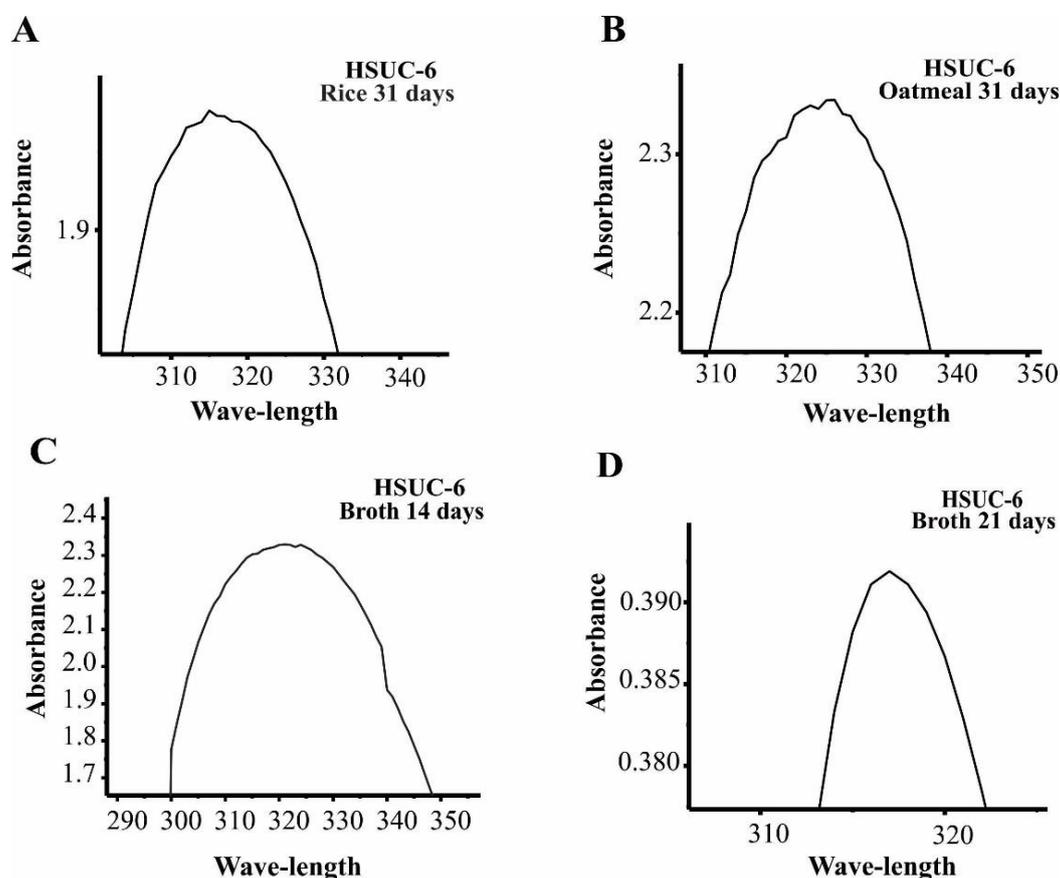


Fig. (2). Complexity of extracts obtained under different fermentation conditions. Fig 2A: UV spectrum of HSUC-6 extract produced in rice at 31 days of fermentation. 2B: UV spectrum of oat-produced HSUC-6 extract within 31 days of fermentation. 2C: UV spectrum of broth HSUC-6 extract produced in 21 days of fermentation. 2D: UV spectrum of broth HSUC-6 extract on 21 days of fermentation.

The UV spectra of HSUC-6 (*Penicillium maximae*) extracts indicated that different substances may have been produced when the fungus was grown on solid media (oats and rice), as shown in Figure 2, because the UV spectra of solid media show peaks not observed in the UV spectra of the liquid cultures, presuming a greater complexity of the mixture. The study by Gao et al. [33] reinforces this idea by evaluating HPLC chromatograms of extracts produced by *Penicillium commune* QDS-17 fungus, where it was observed that the fungus produced nine new compounds only when grown on solid substrate, and this production of a wider range of compounds was assumed from the higher number of peaks when compared to liquid cultures.

This was also observed in the comparative study of the metabolic profile of the fungus *Aspergillus carneus* associated with sea sponge (*Agelas oroides*). The fungus was cultivated in solid medium rice with sea salt, rice without sea salt and in modified Czapeck broth. Of the three new isolated compounds, isopropylchaetominin was observed in the three culture media used. Isoterrelumamide A was produced only when the fungus was grown in modified Czapeck and 5'-epi-averufanin was isolated only when the fungi were grown in solid rice with or without sea salt [29], adding to the idea that the fermentation condition may alter the metabolic pathway of a given microorganism in a culture environment, favoring the production of new bioactive compounds [34].

3.6 Large Scale Fermentation

Large-scale oat yields obtained after 39 days of fermentation were compared with oat-media yields at 11 and 31 days of smaller-scale fermentation (Figure 3) by dividing the yield obtained (in grams) by the amount of substrate used in the fermentation (in grams). The mass produced in the 39 days of cultivation was considerably larger than the one produced in smaller scale ($p=0,01171$). However, this condition seems to depend directly on the metabolism of each fungus grown on this substrate.

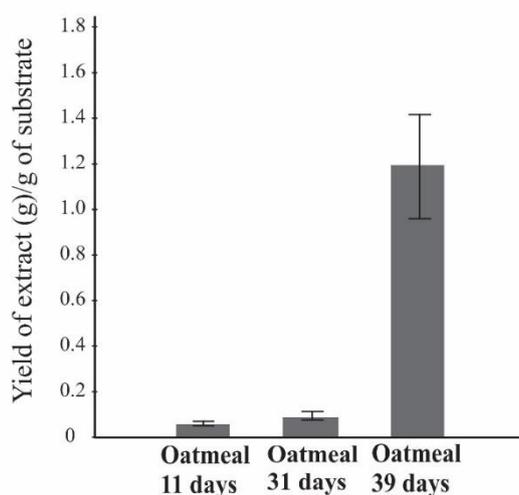


Fig. (3). Comparison of different fermentation scales in oat substrate ($p=0.01171$).

3.7 Antimicrobial Activity of Partially Purified Fractions

The active fractions (Figure 4A) of the IS-9 (*Fusarium oxysporum*) and HSUC-6 (*Penicillium maximae*) fungi were tested for antimicrobial activity by bioautography. Activity was observed from one of the bands of the PAP Fil3 fraction of *P. maximae* against *E. coli* (Figure 4C). However, in the MIC test, the fraction was not active against *E. coli* at any of the concentrations tested (Figure 4D). Presumably the bioactive compounds were in insufficient concentration in the fraction tested to evidence the antimicrobial activity in this test.

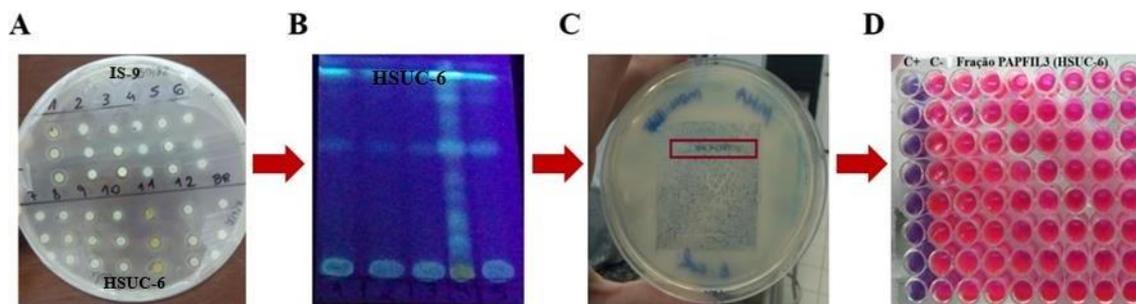


Fig. (4). Evaluation of antimicrobial potential of partially purified fractions. Fig 4A: Antimicrobial activity test of HSUC-6 fractions after disk diffusion partition. Fig 4B: Thin Layer Chromatography of partially purified fractions. Fig 4C: Bioautography of HSUC-6 fractions against inhibition-spotted *E. coli* (Rf=0.80). Fig 4D: Minimum inhibitory concentration test of PAP Fil3 fraction of *P. maximae* against *E. coli* at concentrations; 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 and 3.9 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

CONCLUSION

In this study, although preliminary, it was observed that solid media appear to provide a more diverse range of antimicrobial active secondary metabolites when compared to liquid cultures. In addition, solid media can guarantee sufficient extract yield for the isolation of the bioactive compounds of interest. However, in liquid cultures extracts with smaller amounts of nonpolar compounds are produced, facilitating later antimicrobial isolation steps.

In the antimicrobial screening program of this working group, considering the problem of rediscovery in this area and based on the results observed here, solid cultivation in rice medium and static fermentation for 39 days at room temperature will be employed in subsequent works.

APPROVAL IN THE ETHICS COUNCIL AND PARTICIPATION CONSENT

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals / humans were used in this study.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Higher Education Personal Improvement Coordination (CAPES) and the PROCAD-Amazon Program.

REFERENCES

- [1] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75(3):311-35.

- [2] Bérdy J. Erratum: Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics* 2012; 65(8), 441–441.
- [3] Raghava Rao KV, Mani P, Satyanarayana B, Raghava Rao T. Purification and structural elucidation of three bioactive compounds isolated from *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 and their biological activity. *Biotech* 2017; 7(1):24.
- [4] Pan R, Bai X, Chen J, Zhang H, Wang H. Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. *Front Microbiol* 2019; 10:294.
- [5] Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck, A. Big Effects from Small Changes: *Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity*. *Chem Bio Chem* 2002; 3(7), 619.
- [6] Zutz C, Bacher M, Parich A, Kluger B, *et al.* Valproic Acid Induces Antimicrobial Compound Production in *Doratomyces microspheres*. *Front Microbiol* 2016; 7:510.
- [7] VanderMolen KM, Raja HA, El-Elimat T, Oberlies NH. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express* 2013; 3(1), 71.
- [8] Cruz AL, Souza FS de, Abegg MA. Anti-Candida and anti-quorum sensing activity of airborne microorganisms detected by a rapid method. *Rev Soc Bras Med Trop* 2019; 52(0).
- [9] Du L, King JB, Morrow BH, Shen JK, Miller AN, Cichewicz RH. Diarylcyclopentendione metabolite obtained from a *Preussia typharum* isolate procured using an unconventional cultivation approach. *J Nat Prod* 2012; 75(10):1819-23.
- [10] Gomes CC, Pinto LCC, Victor FL, *et al.* *Aspergillus* in endodontic infection near the maxillary sinus. *Braz J Otorhinolaryngol* 2015; 81(5): 527–532.
- [11] Tonial F, Maia BHLNS, Gomes-Figueiredo JA, *et al.* Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Curr Microbiol* 2016; 72(2), 173–183.
- [12] Demir E, Basbülbul G. Screening of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Products. *Biotechnol J* 2017; 18(2): 1-9.
- [13] Etame RME, Mouokeu RS, Poundeu FSM, *et al.* Effect of fractioning on antibacterial activity of n- butanol fraction from *Enantia chlorantha* stem bark metanol extract. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19(1):56.
- [14] Silveira LM; Olea RSG, Mesquita JM, Cruz ALN, Mendes JC. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Rev Bras Farm* 2009; 90 (2) 2, 124-128.

- [15] Sanchez JF, Wang CC. The chemical identification and analysis of *Aspergillus nidulans* secondary metabolites. *Methods Mol Biol* 2012; 944:97-109.
- [16] Azerang P, Khalaj V, Kobarfard F, Owlia P, Sardari S, Shahidi S. Molecular Characterization of a Fungus Producing Membrane Active Metabolite and Analysis of the Produced Secondary Metabolite. *Iran Biomed J* 2019; 23(2):121-8.
- [17] Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Dua TK. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *J Pharm Anal* 2015; 5(2):75-84.
- [18] Noumi E, Merghni A, M Alreshidi M, et al. Chromobacterium violaceum and Pseudomonas aeruginosa PAO1: Models for Evaluating Anti-Quorum Sensing Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and Its Main Component Terpinen-4-ol. *Molecules* 2018; 23(10).
- [19] Rani R, Sharma D, Chaturvedi M, Yadav JP. Antibacterial activity of twenty different endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* and time kill assay. *Clin Microbiol* 2017; 6(3):280.
- [20] Scopel M, Mothes B, Lerner CB, Henriques AT, Macedo AJ, & Abraham WR. Arvoredol—An unusual chlorinated and biofilm inhibiting polyketide from a marine *Penicillium* sp. of the Brazilian coast. *Phytochem Lett* 2017; 20, 73–76.
- [21] Awaad AS, Nabilah AJA, & Zain ME. New Antifungal Compounds from *Aspergillus terreus* Isolated from Desert Soil. *Phytother Res* 2012; 26(12), 1872–1877.
- [22] Katoch M, Phull S, Vaid S, & Singh S. Diversity, Phylogeny, anticancer and antimicrobial potential of fungal endophytes associated with *Monarda citriodora* L. *BMC Microbiol* 2017; 17(1).
- [23] Adpressa DA, Loesgen S. Bioprospecting Chemical Diversity and Bioactivity in a Marine Derived *Aspergillus terreus*. *Chem Biodivers* 2016; 13(2), 253–259.
- [24] Ochi K. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *J Antibiot* 2016; 70(1), 25–40.
- [25] Chagas MBO, Prazeres Dos Santos I, Nascimento da Silva LC, Correia MTDS, Magali de Araújo J, Cavalcanti MDS, Lima VLM. Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic Fungi Associated with *Hancornia speciosa* Gomes Bark. *Open Microbiol J* 2017; 11:179-188.
- [26] Li YF, Wu XB, Niaz SI, et al. Effect of culture conditions on metabolites produced by the crinoid- derived fungus *Aspergillus ruber* 1017. *Nat Prod Res* 2016; 31(11), 1299–1304.
- [27] Tchoukoua A, Hasegawa R., Hendracipta KA, Sato S, Koseki T, Shiono Y. Structure elucidation of new fusarielins from *Fusarium* sp. and their antimicrobial activity. *Magn Reson Chem* 2017; 56(1), 32– 36.

- [28] Li W, Ding L, Wang N, Xu J, Zhang W, Zhang B, Jin H. Isolation and Characterization of Two New Metabolites from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus* sp. LS34 by OSMAC Approach. *Mar Drugs* 2019; 17(5), 283.
- [29] Özkaya FC, Ebrahim W, El-Neketi M, et al. Induction of new metabolites from sponge-associated fungus *Aspergillus carneus* by OSMAC approach. *Fitoterapia* 2018; 131:9-14.
- [30] Yue Y, Yu H, Li R, Xing R, Liu S, & Li P. Exploring the Antibacterial and Antifungal Potential of Jellyfish-Associated Marine Fungi by Cultivation-Dependent Approaches. *Plos One* 2015; 10(12), e0144394.
- [31] Hemphill CFP, Sureechatchaiyan P, Kassack MU, et al. OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. *J Antibiot* 2017; 70(6), 726–732.
- [32] Wang B, Park EM, King JB, et al. Transferring Fungi to a Deuterium-Enriched Medium Results in Assorted, Conditional Changes in Secondary Metabolite Production. *J Nat Prod* 2015; 78(6):1415-21.
- [33] Gao SS, Shang Z, Li XM, Li CS, Cui CM, Wang BG. Secondary Metabolites Produced by Solid Fermentation of the Marine-Derived Fungus *Penicillium commune* QSD-17. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76(2), 358–360.
- [34] Romano S, Jackson SA, Patry S, Dobson ADW. Extending the "One Strain Many Compounds" (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. *Mar Drugs* 2018; 16(7).

5. METODOLOGIA COMPLEMENTAR

5.1 Identificação Morfológica

Os 27 fungos inicialmente incorporados à coleção de pesquisa foram identificados a nível de gênero por meio de análises macro e microscópicas das colônias crescidas em meio Ágar Batata Dextrose (BDA). Inicialmente os fungos foram repicados em BDA e incubados a 28 °C durante 10 dias. Das culturas crescidas foram analisados os aspectos macro morfológicos das colônias, tais como: aspecto de borda e contorno, topografia do Anverso e Verso.

Para a análise microscópica foram preparadas lâminas contendo o corante lactofenol azul de algodão onde foram depositados fragmentos das colônias fúngicas, em seguida foi adicionada a lamínula e o material foi analisado à microscopia com objetiva de 100x. A análise contou com a identificação de características estruturais e vegetativas dos fungos tais como; a presença de hifas septadas ou cenocíticas, coloração das hifas, presença dos corpos de frutificação, bem como a presença de esporos (GOMES *et al.*, 2015). A metodologia adotada neste estudo foi detalhada no fluxograma incorporado ao anexo II.

5.2 Métodos de Preservação

Os fungos foram preservados por meio de duas técnicas; *Castellani* e Óleo Mineral. Todos os isolados da coleção foram cultivados em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) a 28 °C e em ciclo claro/escuro durante sete dias. Das colônias crescidas, foram recortados cinco *plugs* (7 mm) dos quais foram transferidos para tubos de vidro contendo 4 ml de água destilada estéril, seguindo o método *Castellani* de preservação (PASSADOR *et al.*, 2010).

Os fungos também foram repicados para tubos de vidro contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) sob cultivo inclinado, onde foram cultivados a 28 °C durante setes dias. Após crescimento das colônias, foi adicionado de forma asséptica uma camada de Óleo Mineral (Nujol-densidade 0,838 g/ml, previamente esterilizado por autoclavagem dupla com duração de 15 minutos, a 121 °C e 1 atm de pressão) até o ponto mais alto do meio inclinado. Em seguida, os tubos foram vedados e armazenados a temperatura ambiente (ZERMEÑO *et al.*, 2017). Após 12 meses dos processos de preservação (*Castellani* e Óleo Mineral) foi avaliada a viabilidade dos isolados com base nas características morfológicas de cada cultura reativada.

5.3 Cultivo em Escala Piloto

Dos 27 fungos que faziam parte da coleção, foram selecionados 12 fungos filamentosos (6 isolados do solo e 6 fungos anemófilos) dos quais foram submetidos ao cultivo em escala piloto. Para isto, duas condições de cultivo foram avaliadas, incluindo dois meios sólidos e um

meio líquido. Os meios sólidos foram produzidos em substrato arroz e aveia (10 g de arroz ou aveia ressuspensos em 25 mL de água destilada, submetidos a 121 °C, a 1 atm por 30 minutos), e como meio líquido foi utilizado o Czapeck Dox, produzido de acordo com as normas do fabricante (Kasvi).

Inicialmente, os fungos foram cultivados em Ágar Extrato de Malte a 2 % (MEA 2%) durante 10 dias a 28 °C para o crescimento das colônias. Para o cultivo em caldo, dez *plugs* de 7 mm de diâmetro foram recortados da cultura fúngica e adicionados a 250 mL do caldo Czapeck. As culturas foram fermentadas a 28 °C, sob agitação orbital a 100 rpm durante 14 e 21 dias (Conforme Figura 5).

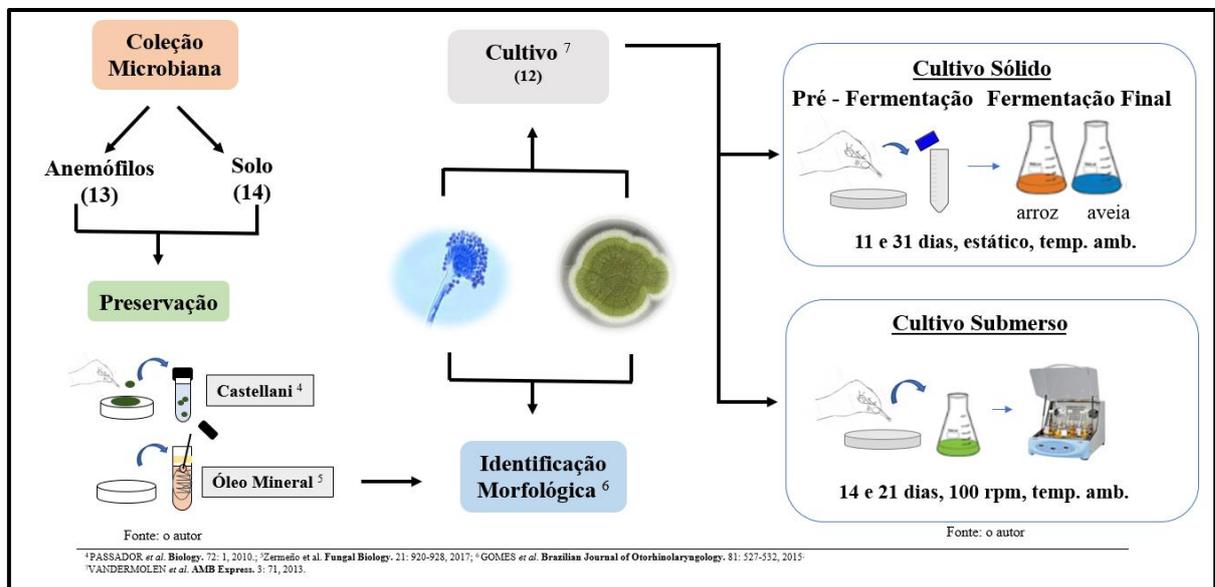


Figura 5. Fluxograma de metodologias adotadas no estudo.

Para o cultivo sólido, cinco discos de 7 mm de diâmetro foram recortados da cultura fúngica e adicionados a 15 mL do caldo de pré-fermentação (YESD = 20 g de peptona de soja, 20 g de dextrose, 5 g de extrato de levedura, 1000 ml de água destilada), etapa na qual ocorreu sob agitação orbital (100 rpm) durante 3 dias. Ao final da pré-fermentação, a cultura (caldo YESD contendo a massa micelial) foi transferida para os meios de cultivo sólidos arroz e aveia, dando início a segunda etapa fermentativa. As culturas sólidas foram fermentadas de forma estática, a temperatura ambiente e durante 11 e 31 dias de cultivo (VANDERMOLEN *et al.*, 2013).

5.4 Extração da Cultura de Fungos

Após cultivo em escala piloto foram adicionados 50 mL de álcool metílico P.A nas culturas sólidas e 250 mL do mesmo solvente nas culturas líquidas. Em seguida o material fermentado foi extraído sob agitação orbital a 100 rpm, durante 24 horas a temperatura ambiente. Os extratos brutos metanólicos foram concentrados em evaporador rotativo e testados para a atividade antimicrobiana pela técnica de *Spot* (DEMIR; BASBÜLBÜL, 2017).

5.5 Teste de Extratos para Atividade Antimicrobiana

5.5.1 *Micro-organismos teste*

Foram utilizados como micro-organismos teste as cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*, pertencentes a coleção microbiana do Laboratório de Diversidade e Motilidade Microbiana (LDM) do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia - ICET/Itacoatiara. As cepas foram mantidas em estoque em freezer a -20°C em caldo Luria Bertani (LB)(composição g/L: 29 caseína enzimática hidrolisada 10,0g, extrato de levedura 5,0g, cloreto de sódio 10,0g, pH: 7,5 ± 0.2) adicionado de 20% de glicerol.

5.5.2 *Teste de Atividade Antimicrobiana*

Os extratos brutos foram testados para atividade antimicrobiana por meio da técnica em *Spot* (DEMIR; BASBÜLBÜL, 2017). Inicialmente, foram produzidas suspensões padronizadas (0,02 para *E. coli* e *Salmonella* sp. e 0,05 para *Staphylococcus aureus*) com absorbância ajustada em Espectrofotômetro (Biospectro, SP- 22)(OD = 600 nm). Os extratos foram solubilizados em água destilada estéril na concentração de 200 mg/mL. As suspensões dos micro-organismos teste foram adicionadas sobre o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (MHA) solidificado, onde 10 µl dos extratos brutos foram pipetados em três pontos equidistantes. O teste foi realizado em triplicata e a água estéril foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram interpretados com base na formação de halos de inibição (analisados em milímetros) após 24 horas de incubação a 37 °C.

5.6 Cultivo Sólido em Larga Escala

Foram selecionados 10 fungos filamentosos para a realização dos cultivos em maior escala. Dos fungos selecionados foram recortados 20 *plugs* (7 mm) dos quais foram submetidos à pré-fermentação em caldo YESD. Nesta etapa, foram utilizados 2 tubos tipo Falcon contendo 15 ml do caldo de pré-fermentação e 10 *plugs* da cultura fúngica (2 tubos para cada fungo). Os tubos foram cultivados em agitação orbital (100 rpm) durante cinco dias. O material pré-

fermentado foi adicionado sobre balões de cultivo de 2 L contendo o meio sólido aveia (400 g de aveia em 300 ml de água destilada).

A cultura despejada sobre o meio sólido foi homogeneizada por maceração, vedada com tampões de algodão e cultivada a temperatura ambiente sob a condição estática por 39 dias. A cultura foi extraída com metanol (1,5 L foram adicionados a cada balão de cultivo), uma alíquota do material seco foi ressuspensionado em DMSO a 1% e 2% na concentração de 10 mg/ml. Para a confirmação da atividade antimicrobiana da cultura em grande escala os extratos foram submetidos ao teste de atividade por *Spot* (DEMIR; BASBÜLBÜL, 2017).

5.7 Purificação Parcial dos Metabólitos Secundários

5.7.1 Fracionamento dos Extratos

Os extratos brutos produzidos nos cultivos em escala piloto e em larga escala foram particionados líquido-líquido por três vezes com cada solvente empregado. Para isto, foram utilizados três solventes em ordem crescente de polaridade: Hexano (C₆H₁₄), Clorofórmio (CHCl₃) e Acetato de Etila (C₄H₈O₂) na proporção 1:1 (v/v) (ETAME *et al.* 2019). Após particionamento, quatro frações foram geradas, sendo denominadas; Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FA) e a Fração Remanescente (FR).

As frações obtidas foram levadas à secura em evaporador rotativo e suas massas foram determinadas por pesagem em balança analítica. O rendimento das frações foi calculado em gramas e as frações foram testadas para a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (SILVEIRA *et al.*, 2009).

5.7.2 Cromatografia em Coluna

Dois extratos (HSUC-6 e IS-9) produzidos a partir do cultivo dos fungos *P. maximae* e *F. oxysporum* em larga escala foram submetidos a processos de purificação. Os extratos foram particionados líquido-líquido e as frações de maior polaridade foram submetidas a Cromatografia em Coluna sob sílica em gel Merck®60 (granulometria 0,063-0,200 mm) para purificação dos compostos bioativos.

A fração acetato de etila (IS-9 AC produzida pelo fungo *F. oxysporum*) foi eluída com a mistura de clorofórmio:metanol (90:10) em porções de 100 mL, com incremento de 10% de metanol em cada porção. Após a eluição da amostra IS-9 AC foram geradas 50 frações semi-purificadas.

A fração Remanescente (HSUC-6 RM produzida pelo *P. maximae*) foi eluída com a mistura de acetato de etila:metanol (90:10) em porções de 100 mL, com incremento de 10% de metanol em cada porção. Ao final do processo de eluição foram geradas 81 frações semi-purificadas (SANCHEZ; WANG, 2012).

5.7.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As frações individualmente recolhidas no processo de separação em coluna foram analisadas através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando placas cromatográficas padrão (Merck®) recobertas com Sílica em gel (AZERANG *et al.*, 2019). As frações foram solubilizadas em metanol, aplicadas sobre as cromatoplacas, eluídas em sistema: clorofórmio:acetato de etila (2:8) e observadas em Câmara de Luz UV (Biothec, BT107) (λ 250 nm e 350 nm).

Das bandas isoladas foram calculados os valores de R_f (Fator de Retenção) e as frações com padrão de bandas semelhantes foram reunidas, formando faixas de interesse. As frações parcialmente purificadas foram testadas para a atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar seguindo o protocolo de Silveira *et al.* (2009).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

6.1 Identificação Morfológica dos fungos

Um total de 27 fungos obtidos de amostras do solo e ar do ambiente Amazônico foram selecionados para compor a coleção deste estudo. Em análise morfológica das colônias crescidas em meio BDA os fungos foram identificados a nível de gênero (Figura 6).

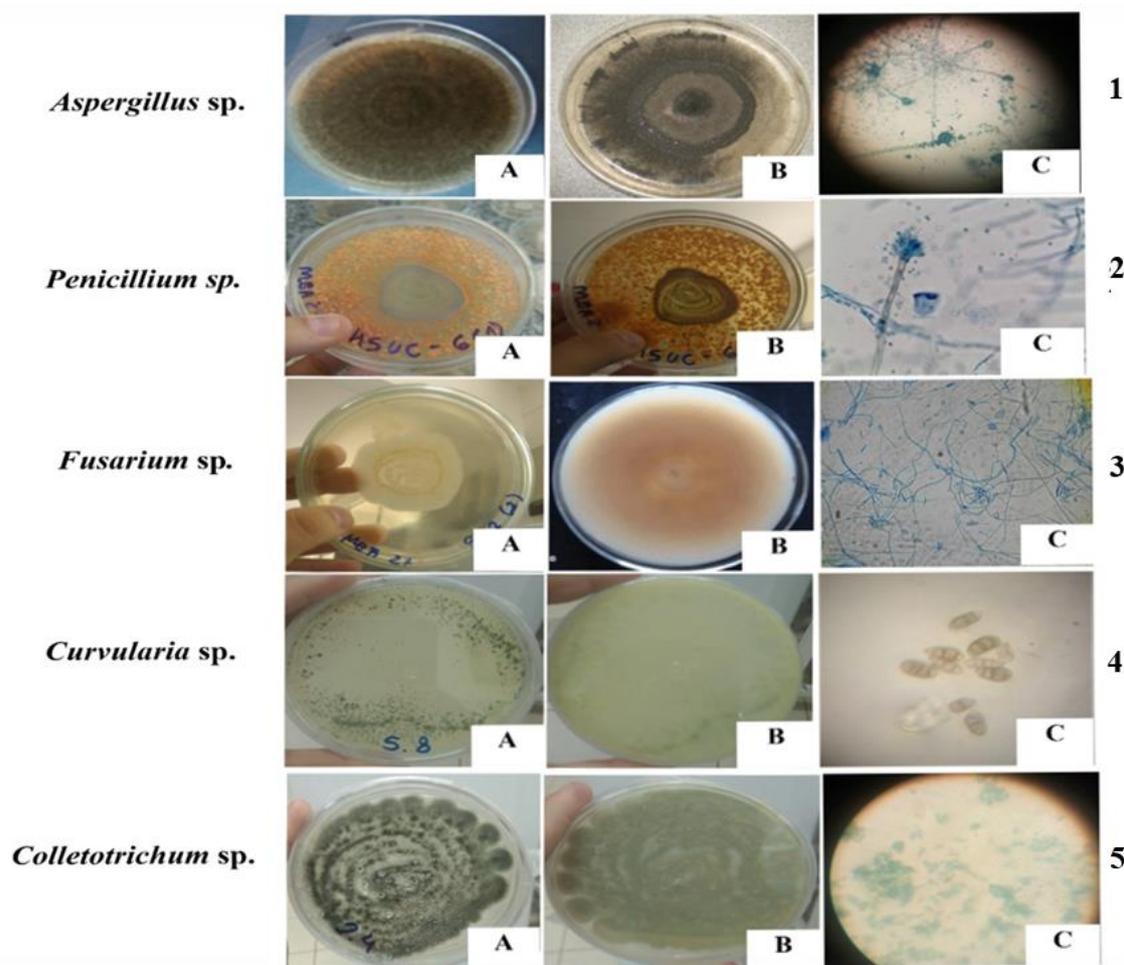


Figura 6. Identificação dos fungos. Fig 1 A: Anverso da placa de *Aspergillus* sp. com colônias de aspecto pulverulento, coloração marron; Fig. 1 B: Verso das colônias; Fig 2 C: Corpos de frutificação aparentes, hifas septadas e fialídes características do gênero; Fig 2 A: Anverso da placa de *Penicillium* sp. com aspecto algodinoso e coloração laranja-esverdeado; Fig.2 B: Verso da placa com pigmentos; Fig. 2 C: Análise dos corpos de frutificação característicos; Fig. 3 A: Anverso da colônia de *Fusarium* sp. com coloração marron na zona central e branca na zona marginal; Fig. 3 B: Verso da colônia; Fig. 3 C: Macroconídios hialinos apresentado de 3-6 septos; Fig. 4 A: Anverso da colônia de *Curvularia* sp. com características pulverulentas e de coloração esverdeada; Fig. 4 B: Verso da placa com pigmentação branca; Fig. 4 C: Análise microscópica dos corpos de frutificação do isolado; Fig. 5 A: Anverso das colônias de *Colletotrichum* sp. com coloração esverdeada, 5 B: Verso da placa com observação de pigmentação esbranquiçada; Fig. 5 C: Análise microscópica de corpos de frutificação e hifas em formato de cordão.

Fonte: Negreiros (2019)

Por análise morfológica os fungos foram categorizados em cinco gêneros distintos: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp. Dos 21 fungos identificados como prováveis representantes do gênero *Aspergillus* sp., 8 foram isolados de amostras do ar e 13 isolados de amostras do solo. Dois representantes do gênero *Penicillium* sp. foram identificados neste estudo, sendo um isolado obtido de cada grupo de amostras (1 do solo e 1 anemófilo). Os demais gêneros (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp.) foram isolados somente nas amostras do ar (Anexo I).

No presente estudo, entre os gêneros mais frequentemente isolados de amostras de solo e ar do ambiente Amazônico encontra-se o *Penicillium* e o *Aspergillus*. Estes dados estão de acordo com outros estudos que visam o isolamento de fungos anemófilos e de solos de diferentes regiões brasileiras (MEZZARI *et al.*, 2002; CAVALCANTI, *et al.*, 2006; PINOTTI *et al.*, 2011).

6.2 Viabilidade dos Fungos Preservados

Com base nas características morfológicas das colônias, estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos preservados em *Castellani* e em Óleo Mineral, foi avaliada a viabilidade dos isolados. Dos 14 fungos isolados do solo e preservados pela técnica de Castellani, cerca de 11 (84,62%) apresentaram-se viáveis pós reativação das colônias. Em contraste, os mesmos isolados quando preservados em Óleo Mineral não sobreviveram a esta condição. Somente 3 (23,08%) fungos do solo foram eficazmente preservados pelo método supracitado, o que sugere a predominância da viabilidade dos fungos preservados em água destilada (Figura 7).

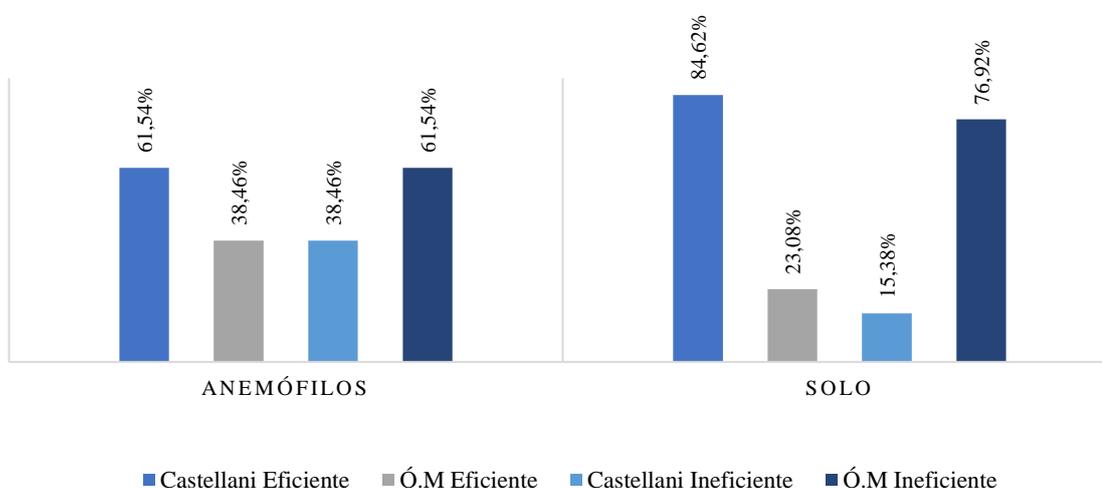


Figura 7. Preservação dos fungos filamentosos do solo e anemófilos.

Conforme os dados obtidos, a predominância pela técnica de *Castellani* também ocorreu sobre os fungos anemófilos. Dos 13 isolados do ar 8 (61,54%) mantiveram suas características originais pós reativação e, somente 5 (38,46%) foram eficazmente mantidos pelo método em Óleo Mineral. Neste sentido, nota-se que o método de preservação Castellani é superior ao Óleo Mineral tanto para os fungos isolados do solo quanto aos fungos filamentosos isolados do ar.

É necessário considerar que não há um método universal para a preservação de um grande número de micro-organismos, uma vez que o processo de conservação depende de aspectos intrínsecos de cada cepa estudada (SILVA *et al.*, 2019). Entretanto, o método Castellani é amplamente utilizado na literatura por ser menos dispendioso, de fácil execução e render boa recuperação dos espécimes estocados (SAKR, 2018).

6.3 Análise Individual das Condições de Cultivo em Escala Piloto

Após obtenção dos extratos brutos as massas secas foram mensuradas e comparadas entre os diferentes substratos sólidos (Arroz x Aveia - 11 dias de fermentação e Arroz x Aveia- 31 dias de fermentação). Também foi avaliado o rendimento de cada extrato produzido entre os diferentes períodos de cultivo no mesmo substrato (Arroz x Arroz 11 dias de cultivo e Aveia x Aveia 31 dias de cultivo).

De acordo com a figura 8 A, observou-se que em geral os rendimentos obtidos entre os diferentes substratos sólidos (Arroz x Aveia) não apresentaram diferenças significativas nos primeiros 11 dias de fermentação ($p = 0,3141$). Em análise individual (Figura 8 C), as massas secas mensuradas apresentaram de fato diferenças mínimas neste período.

Em 31 dias de cultivo a massa produzida nos diferentes substratos sólidos (Arroz x Aveia) (Figura 8 B) também não diferiu ($p = 0,4417$). Embora, em análise individual alguns fungos apresentaram aumento de sua biomassa neste período de fermentação (Figura 8 D), em especial os fungos TPP 1.1, 8.4, 2.5 e 8.2 que produziram maior massa no cultivo aveia comparado ao produzido em cultivo arroz. Em contrapartida, os fungos 7.4 e 8.5 aumentaram sua biomassa no cultivo em arroz comparado ao que foi produzido no substrato aveia (Figura 8 D).

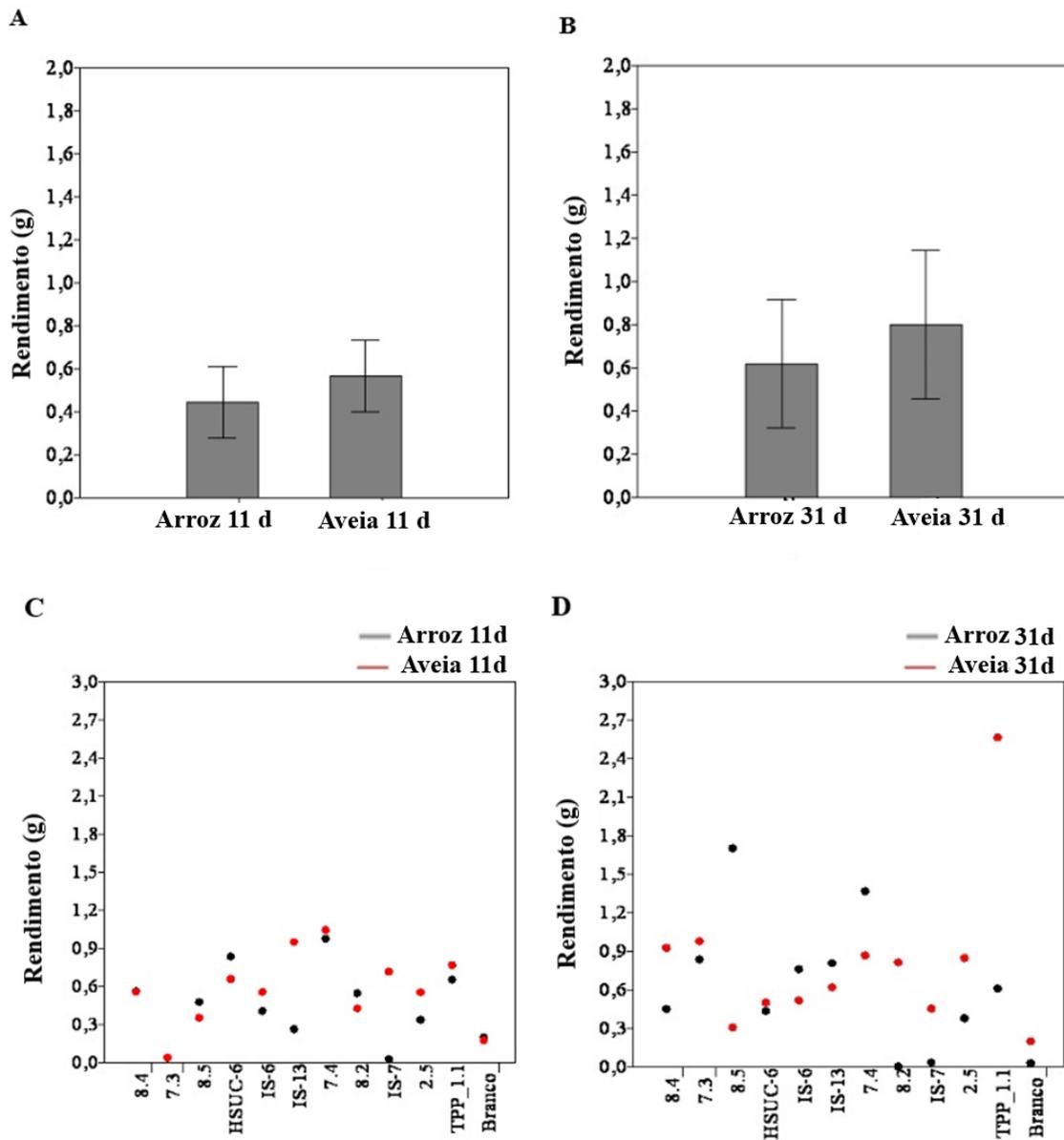


Figura 8. Rendimento dos extratos produzidos nos cultivos sólidos de 11 e 31 dias. Fig 8A: Comparação geral entre a massa seca dos extratos de arroz e aveia nos 11 dias de fermentação ($p=0,3141$). Fig 8B: Comparação geral da massa seca dos extratos arroz e aveia nos 31 dias de fermentação ($p=0,4417$). Fig 8C: Comparação individual dos extratos arroz e aveia nos 11 dias de cultivo. Fig 8D: Comparação individual dos extratos de arroz e aveia nos 31 dias de cultivo.

O rendimento dos extratos também foi avaliado para os fungos cultivados no mesmo substrato sólido (Arroz x Arroz 11 dias de cultivo e Aveia x Aveia 31 dias de cultivo) em diferentes períodos de fermentação, conforme exposto na Figura 9.

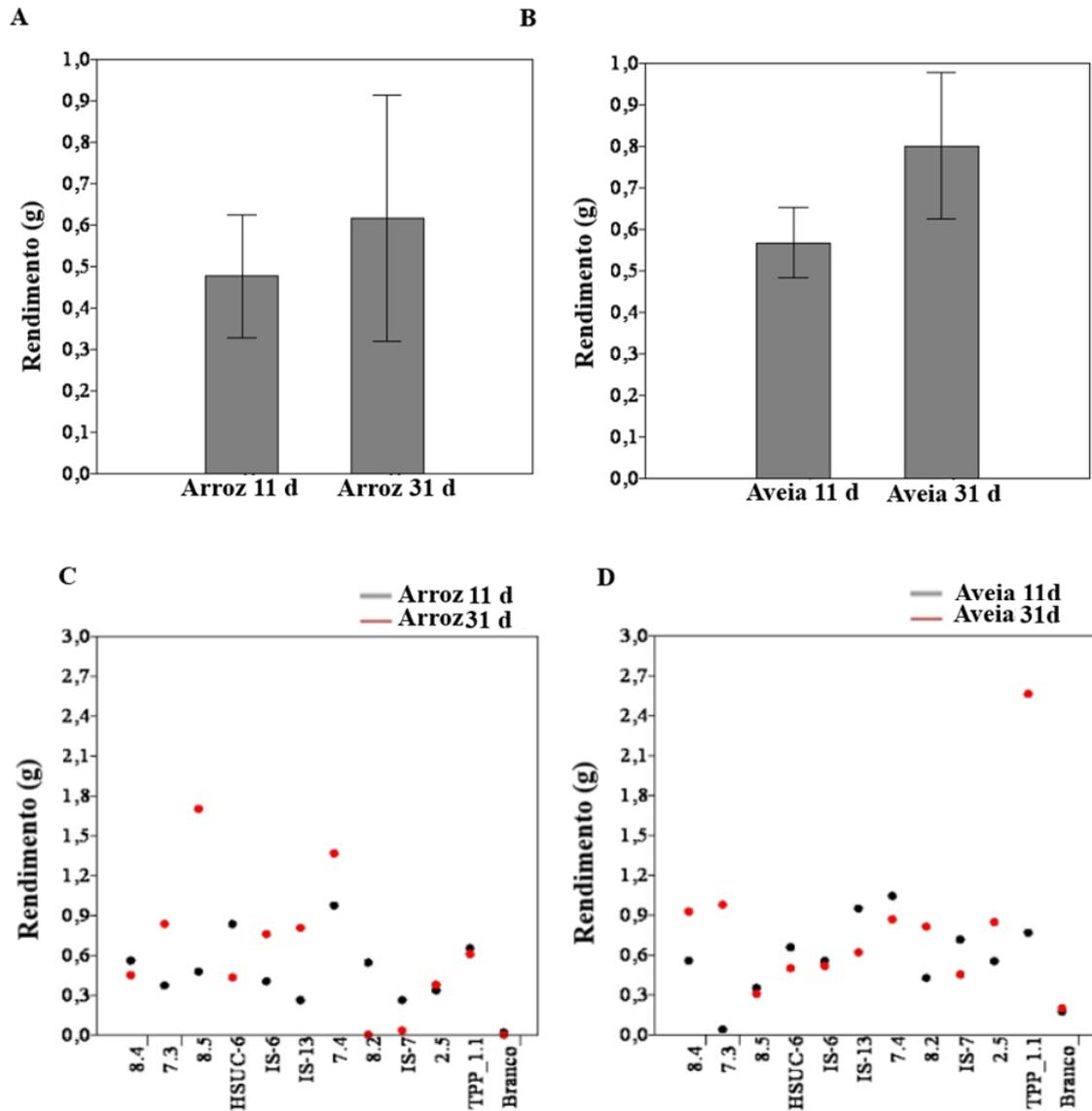


Figura 9. Rendimento dos extratos produzidos no mesmo substrato sólido em diferentes períodos de cultivo. Fig 9A: Comparação geral das massas secas dos extratos de arroz nos 11 e 31 dias de cultivo ($p = 0,4193$). Fig 9B: Comparação geral das massas secas dos extratos de aveia nos 11 e 31 dias de cultivo ($p = 0,2444$). Fig 9C: Comparação individual dos extratos fúngicos cultivados em arroz aveia nos 11 e 31 dias de fermentação. Fig 9D: Comparação individual dos extratos fúngicos cultivados em aveia nos 11 e 31 dias de fermentação.

De acordo com a análise geral dos rendimentos obtidos nos cultivos em arroz de 11 e 31 dias de fermentação (Figura 9 A), as massas produzidas neste substrato não foram quantitativamente diferentes entre os dois períodos avaliados ($p = 0,4193$). Entretanto, as massas obtidas no cultivo em arroz no período de 31 dias foram substancialmente maiores para os fungos 8.5 e 7.4 quando comparadas as massas produzidas pelos mesmos micro-organismos nos primeiros 11 dias de fermentação neste substrato (Figura 9 C).

Analisando os rendimentos dos extratos produzidos nos cultivos em aveia entre os períodos de 11 e 31 dias de fermentação (Figura 9 B), observou-se que não houve diferenças significativas entre as massas secas produzidas neste substrato nos diferentes períodos testados ($p = 0,2444$). Contudo, avaliando individualmente os rendimentos apresentados por cada extrato, observou-se que os fungos TPP 1.1, 8.4 e 7.3 produziram massas relativamente maiores quando cultivados em 31 dias de fermentação (Figura 9 D).

Os rendimentos dos extratos produzidos em caldo Czapeck também foram analisados entre dois períodos de fermentação (14 e 21 dias). Ao serem analisadas as médias dos rendimentos obtidos entre os 14 e 21 dias fermentação (Figura 10 A), observou-se que os extratos apresentaram massas similares entre os diferentes períodos testados ($p = 0,07619$). Contudo, em análise individual dos rendimentos obtidos por esta via de fermentação (Figura 10 B), notou-se que a maior produção de compostos se deu nos primeiros 14 dias de fermentação, em especial para os fungos HSUC-6, TPP 1.1, TPP 1.2, IS- 6, 2.5 e IS-7.

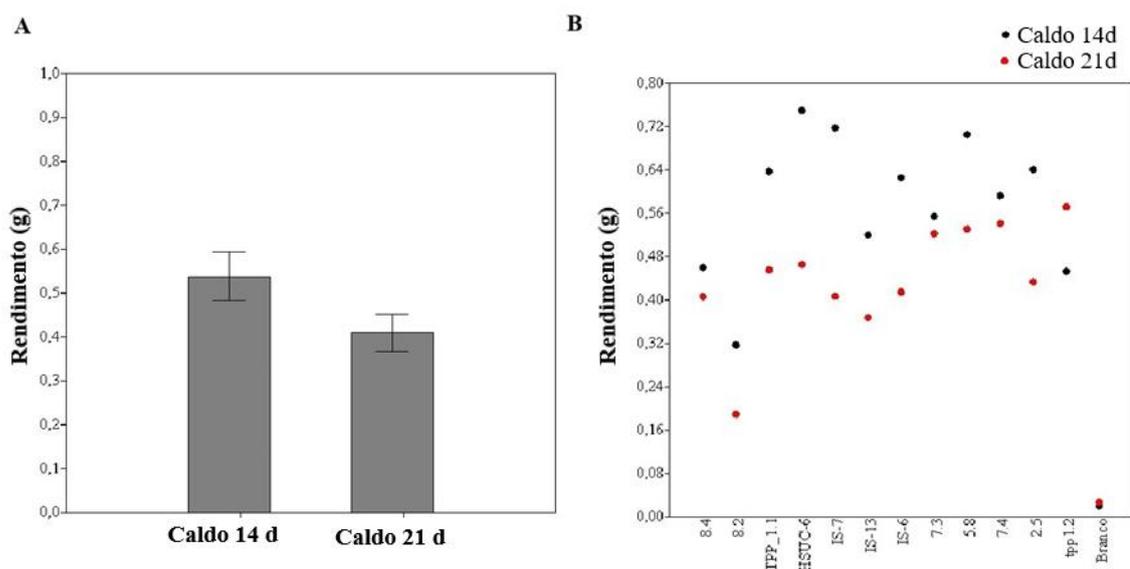


Figura 10. Rendimento do caldo de 14 e 21 dias de cultivo. Fig 10A: Rendimento dos extratos produzidos em 14 dias cultivo ($p = 0,07619$). Fig 10B: Rendimento dos extratos produzidos em 21 dias de cultivo.

É válido ressaltar que os rendimentos dos cultivos sólidos foram substancialmente maiores que os apresentados pelos cultivos em caldo Czapeck em todos os períodos de fermentação. Fato que também foi observado no estudo de VanderMolen *et al.* (2013), onde as culturas crescidas em meios sólidos produziam extratos com massas de uma a duas ordens de grandeza maiores do que o mesmo fungo cultivado nos meios líquidos.

Além disto, os cultivos sólidos vêm sendo empregados na literatura como uma alternativa para a exploração da quimiodiversidade metabólica dos fungos. Isto porque estas fontes nutricionais podem favorecer a produção de compostos que por vezes não são biossintetizados nos cultivos em meio líquido (LI *et al.*, 2019). Em boa parte dos estudos, as análises espectroscópicas dos perfis de absorvância em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) confirmam esta diversidade.

O estudo de Yue *et al.* (2015) corrobora com esta ideia, uma vez que ao avaliar os cromatogramas dos diferentes extratos produzidos nos cultivos sólidos de culturas puras e do cocultivo de micro-organismos antagônicos no mesmo substrato, os picos de absorvância dos extratos sólidos foram diferentes dos observados nas culturas líquidas.

6.3.1 Rendimento das Frações

Após análise das frações obtidas do cultivo em arroz de 31 dias (Figura 11 A), concluiu-se que não houve diferenças significativas quanto as massas das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila ($p = 134$). Sugerindo que grande parte dos compostos extraídos permaneceram retidos na fração remanescente.

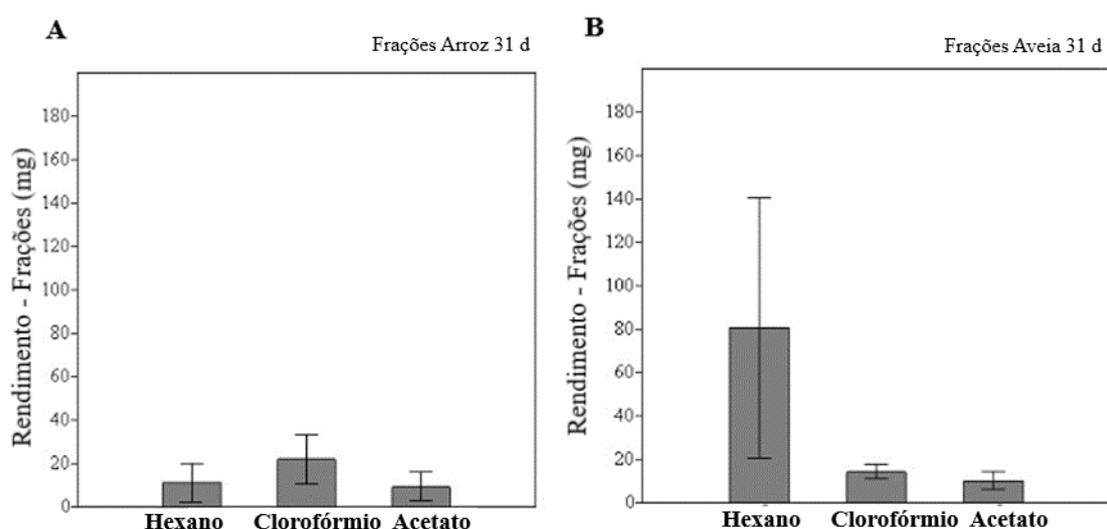


Figura 11. Rendimento das frações obtidas nos cultivos sólidos em 31 dias de fermentação.

Assim também foram analisados os rendimentos das frações obtidas do cultivo em aveia de 31 dias (Figura 11 B). Por meio da comparação média dos rendimentos obtidos entre as frações foi evidenciado que as massas produzidas apresentaram diferenças entre si e que esta diferença foi observada na fração hexano ($p = 0,0132$). Este fato pode indicar que boa parte dos compostos produzidos por esta via de fermentação possuem características mais apolares e por isto foram solubilizados na fração hexano.

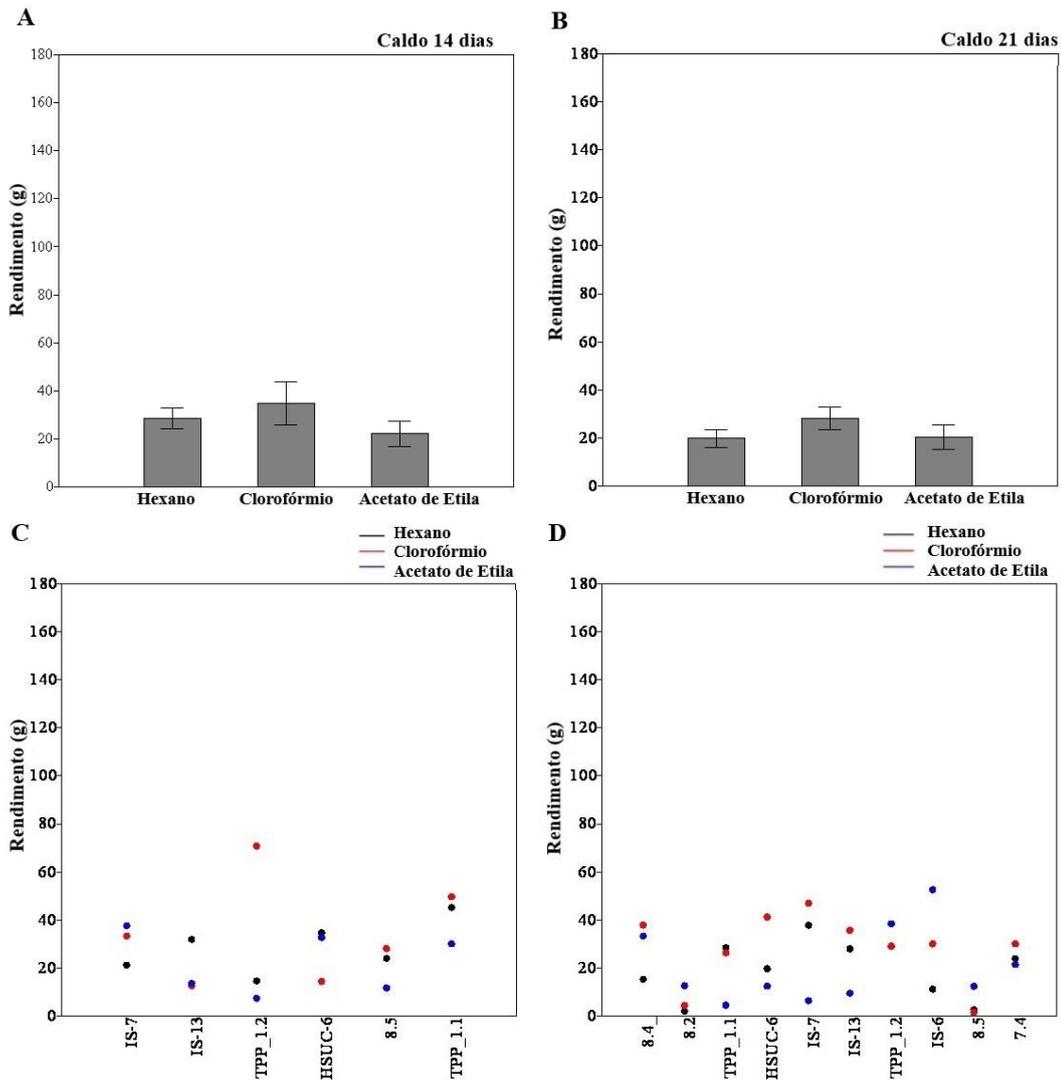


Figura 12. Rendimento das frações obtidas dos caldos de 14 e 21 dias de cultivo. Fig 12A: Massa seca das frações obtidas em 14 dias de cultivo ($p=0,418$). Fig 12B: Massa seca das frações obtidas em 21 dias de cultivo ($p=0,345$). Fig 8C: Massa seca das frações de 14 dias analisadas individualmente. Fig 12D: Massa seca das frações de 21 dias analisadas individualmente.

O rendimento das frações do cultivo de 14 dias foi comparado (Figura 12 A), contudo as massas secas obtidas entre as frações foram semelhantes ($p = 0,418$). Em análise individual dos rendimentos de cada fração, observou-se que o extrato produzido pelo fungo TPP 1.2 foi mais bem solubilizado em clorofórmio quando comparado as demais frações obtidas (Figura 12 C).

Os rendimentos das frações obtidas nos cultivos de 21 dias também foram comparados quanto a massa obtida (Figura 12 B), entretanto não apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0,345$). Em análise individual, os extratos produzidos pelos fungos HSUC-6, IS-7, 8.4, IS-13 e 7.4 foram mais bem solubilizados na fração clorofórmio (Figura 12 D).

De modo geral, os extratos produzidos em substrato arroz e em caldo Czapeck apresentaram pequeno rendimento nas frações de menor polaridade, o que pode indicar que os compostos com atividade antimicrobiana continuaram solubilizados na fração remanescente (fração aquosa). Entretanto, nos extratos obtidos dos cultivos em aveia foram produzidas maiores quantidades de compostos apolares. Isto porque, a massa seca obtida nas frações hexano foi relativamente significativa quando comparada as demais frações avaliadas (Figura 11 B).

No estudo de VanderMolen *et al.* (2013) o este fato também foi observado, uma vez que após desengorduramento dos extratos sólidos do cultivo em aveia houve uma redução da massa seca total, haja vista que a lavagem com o hexano elimina alguns metabólitos comuns e não desejados (ex. ácidos graxos).

6.4 Análise Individual das Condições de Cultivo em Larga Escala

Os rendimentos dos cultivos em larga escala obtidos após 39 dias de fermentação foram comparados com os rendimentos da escala menor do cultivo em Aveia (11 e 31 dias de fermentação). A massa produzida nos 39 dias foi relativamente maior que a produzida em 11 e 31 dias de fermentação ($p = 0,01171$), como observado na figura 9 A. Entretanto, esta condição parece depender diretamente do metabolismo de cada fungo cultivado neste substrato (Figura 13 B). Os fungos 2.5, 7.4, 7.3 e IS-9 aumentaram substancialmente sua biomassa no cultivo em larga escala com rendimentos na ordem de 16 a 23 g de extrato.

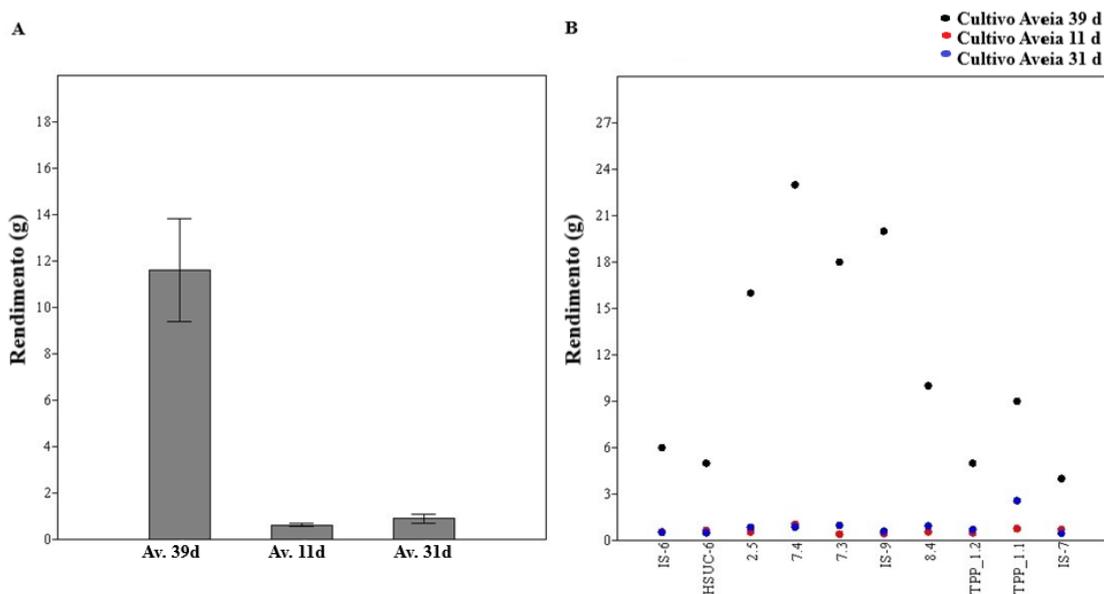


Figura 13. Comparação geral dos rendimentos obtidos em todos os cultivos de aveia. Fig 13A: Análise geral dos rendimentos produzidos nos diferentes períodos de cultivo ($p = 0,01171$). Fig 13B: Análise individual dos rendimentos produzidos por cada fungo cultivado nos diferentes períodos.

6.4.1 Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Larga Escala

Os extratos brutos obtidos na fermentação em larga escala foram testados para atividade antimicrobiana e as médias dos halos de inibição foram analisados em relação aos micro-organismos testados. Em geral, os extratos escalonados testados em DMSO 1% apresentaram potencial antimicrobiano contra ao menos um dos micro-organismos testados (Figura 14 A). Entretanto, não apresentaram tendências de inibição contra um micro-organismo em especial ($p = 0,508715$). Avaliando individualmente os extratos testados em DMSO a 1%, verificou-se que os extratos IS-6 e HSUC-6 foram ativos contra todos os micro-organismos teste (Figura 14 C).

Quanto aos extratos testados em DMSO a 2%, verificou-se que a maior parte dos extratos foi ativa contra *S. aureus* e *E. coli* (Figura 14 B). Entretanto, não houve uma tendência de inibição contra uma das cepas analisadas ($p=0,280043$). Analisando isoladamente os extratos obtidos, notou-se que grande parte do potencial antimicrobiano ocorreu sobre o *S. aureus* com halos de inibição de até 17 mm de diâmetro (Figura 14 D).

Embora o cultivo em larga escala em substrato aveia tenha sido uma alternativa adotada para aumentar a massa bruta final, notou-se a necessidade de realizar processos de purificação mais refinados a fim de isolar os compostos com potencial antimicrobiano. Uma vez que as

etapas de purificação são extremamente necessárias para o sucesso no isolamento dos compostos bioativos (Kankam, 2016).

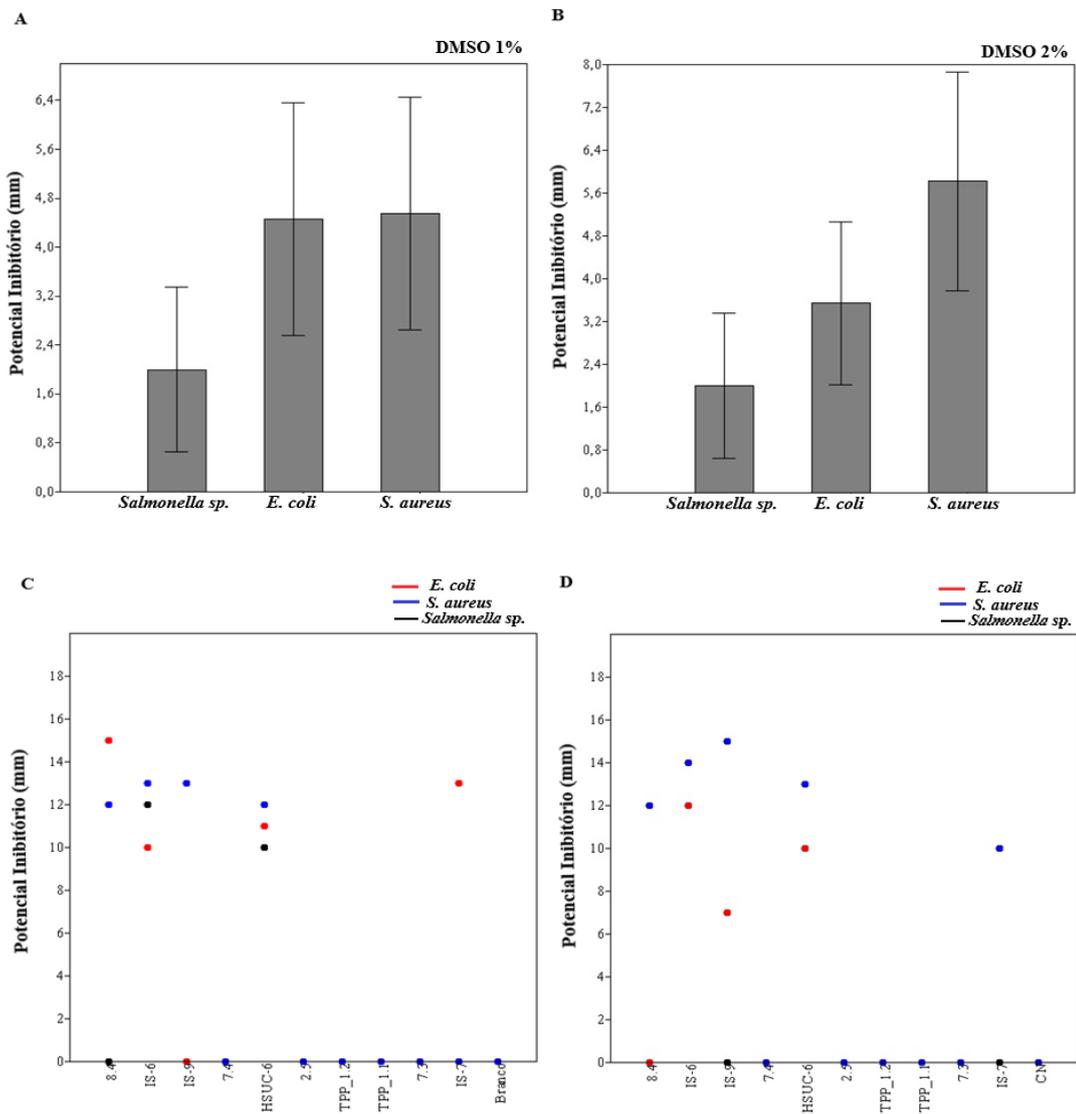


Figura 14. Atividade antimicrobiana dos extratos escalonados em DMSO 1% e 2%. Fig 14A: Potencial geral dos extratos brutos do cultivo escalonado em DMSO 1% ($p=0,508715$). Fig 14B: Potencial geral dos extratos brutos do cultivo escalonado em DMSO 2% ($p = 0,280043$). Fig 14C: Análise individual dos extratos escalonados testados em DMSO 1% contra os micro-organismos teste. Fig 14D: Análise individual dos extratos escalonados testados em DMSO 2% contra os micro-organismos teste.

6.5 Frações Parcialmente Purificadas

Os extratos produzidos no cultivo sólido de larga escala foram parcialmente purificados gerando faixas de interesse conforme tabela 1. O extrato IS-9 (*Fusarium oxysporum*) apresentou 14 distintas faixas, enquanto o extrato HSUC-6 (*Penicillium maximae*) gerou 10 faixas com diferentes perfis.

Tabela 1. Faixas de amostras parcialmente purificadas produzidas pelos fungos IS-9 e HSUC-6.

Nº de faixas	IS-9	HSUC-6
1	F3-4IS	F3-18HSU
2	F5IS	F19-25HSU
3	F7IS	F26-32HSU
4	F6IS	F33-45HSU
5	F9IS	F46-65HSU
6	F10-11-12IS	F66-82HSU
7	F13-14-15-16IS	HSUC-6 FIL LIQ 1
8	F17-18-19IS	HSUC-6 PAP FIL1
9	F20-33MET-IS	HSUC-6 PAP FIL 2
10	F20-33CLO- IS	HSUC-6 PAP FIL 3
11	F33-46IS	-
12	F47-58IS	-
13	F59-62IS	-
14	IS-9 SOL P.	-

Avaliou-se o potencial antimicrobiano das frações parcialmente purificadas obtidas do extrato de HSUC-6 e IS-9, fungos isolados do solo Amazônico (Tabela 2). Neste estudo, as frações do extrato HSUC-6 (produzido por *Penicillium maximae*) foram ativas contra ao menos dois dos três micro-organismos avaliados (*E.coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*). É válido ressaltar que o fungo *P. maximae* é de grande importância por ser pouco explorado devido a seu recente isolamento. Um dos primeiros estudos envolvendo esta espécie encontra-se o trabalho de Scopel et al. (2017) no qual o fungo foi isolado na Costa Brasileira e produziu o composto Arvoredol que apresentou propriedades contra células colorretais e antibiofilme contra *S. epidermidis*.

Tabela 2. Halos de inibição das frações parcialmente purificadas.

Micro-organismo teste	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>
IS-9 SOL P.C	8,5 mm	7,5 mm	-
F5IS	8,6 mm	8,0 mm	-
F7IS	8,3 mm	9,1 mm	7,1 mm
HSUC-6 FIL LIQ 1	7,1 mm	7,2 mm	7,1 mm
HSUC-6 PAP FIL 1	7,4 mm	7,4 mm	7,2 mm
HSUC-6 PAP FIL 2	7,8 mm	-	7,0 mm
HSUC-6 PAP FIL 3	8,0 mm	8,1 mm	7,1 mm

Em relação as frações obtidas do extrato IS-9 (produzido por *Fusarium oxysporum*), 3 frações foram ativas em especial contra *E.coli* e *Salmonella sp.* com halos de inibição que variaram de 8 a 9,1 mm de diâmetro. No estudo de Tchoukoua *et al.* (2018) por sua vez, o cultivo em substrato sólido de fungos do gênero *Fusarium* isolados da superfície de insetos rendeu a produção de três novos compostos (3-epi-fusarielina H, 3-O-metil-fusarielina H e 3-O-metil-epi-fusarielina H) e mais dois análogos conhecidos de fusarielina (fusarielina F e G) dos quais apresentaram potencial antimicrobiano contra *S. aureus* NBCR 13276.

Neste estudo, avaliou-se a influência de diferentes condições de cultivo de fungos filamentosos isolados do ambiente Amazônico em um programa de triagem de antimicrobianos. Foram avaliados aspectos nutricionais e temporais (diferentes períodos de cultivo) em meio ao processo de fermentação de uma gama de espécies de fungos filamentosos, visando selecionar uma condição adequada como etapa preliminar em um programa de triagem de compostos bioativos.

CONCLUSÃO

Neste estudo, embora de forma preliminar, foi observado que os meios sólidos propiciam a obtenção de uma gama mais diversa de metabólitos secundários ativos antimicrobianos quando comparados às culturas líquidas. Ainda, os cultivos sólidos garantem um rendimento de extrato suficiente para o isolamento dos compostos bioativos de interesse. Porém, nas culturas líquidas são produzidos extratos com menor quantidade de compostos apolares, facilitando etapas posteriores de isolamento de antimicrobianos. No programa de triagem de antimicrobianos deste grupo de trabalho, considerando o problema da redescoberta nesta área e em função dos resultados aqui observados, empregar-se-á cultivos sólidos em meio arroz e fermentação estática por 39 dias a temperatura ambiente em trabalhos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ADL, S.M; BASS, D.; LANE, C.E. *et al.* Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. **Journal Eukaryotic Microbiology**, Canada, v. 66, n. 1, p. 4-119, 2019.
- AGRAWAL, S.; ADHOLEYA, A.; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. Marine fungi: An untapped bioresource for future cosmeceuticals. **Phytochemistry Letters**, India, v. 23, p. 15–20, 2018.
- AL-FAKIH, A.A.; ALMAQTRI, W.Q.A. Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. **Mycology**, Yemen, v. 10, n. 4, p. 191-209, 2019.
- ASKENAZI, M.; DRIGGERS, E. M.; HOLTZMAN, D. A.; NORMAN, T. C.; IVERSON, S.; ZIMMER, D. P.; BOERS, M.; BLOMQUIST, P.R.; MARTINEZ, E.J.; MONREAL, A. W.; FEIBELMAN, T.P.; MAYORGA, M. E.; MAXON, M .E.; SYKES, K.; TOBIN, J. V.; CORDERO, E.; SALAMA, S. R.; TRUEHEART, J.; ROYER, J. C.; MADDEN, K. T. (2003). Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. **Nature Biotechnology**, 21(2), 150–156.
- AZERANG, P.; KHALAJ, V.; KOBARFARD, F.; OWLIA, P.; SARDARI, S.; SHAHIDI, S. Molecular Characterization of a Fungus Producing Membrane Active Metabolite and Analysis of the Produced Secondary Metabolite. **Iranian Biomedical Journal**, Iran, v. 23, n. 2, p. 121-8, 2019.
- BARBOSA, R.N.; BEZERRA, J.D.P.; SOUZA-MOTTA, C.M.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A.; OLIVEIRA, N.T.; HOUBRAKEN, J. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Brazil, v. 111, n. 10, p. 1883-1912, 2018.
- BANERJEE, C.; DUBEY, K.K.; SHUKLA, P. Metabolic Engineering of Microalgal Based Biofuel Production: Prospects and Challenges. **Frontiers Microbiology**, India, v. 7, n. 432, 2016.
- BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 65, n. 8, p. 441, 2012.
- BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; LAGHEZZA MASCI, V.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, Italy, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.

BILLS, G.F.; GLOER, J.B. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. **Microbiology Spectrum**, Houston, v. 4, n. 6, 2016.

BODE, H.B.; BETHE, B.; HOF, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chembiochem**, Germany, v. 3, n. 7, p. 619-27, 2002.

BONFANTE, P.; VENICE, F.; LANFRANCO, L. The mycobiota: fungi take their place between plants and bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, Italy, v.49, p. 18-25, 2019.

BORUTA, T.; MILCZAREK, I.; BIZUKOJC, M. Evaluating the outcomes of submerged co cultivation: production of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* in fungal co-cultures. **Applied Microbiology and Biotechnololy**, Poland, v. 103, n. 14, p. 5593-5605, 2019.

BHIMANI, M.D.; GOLAKIYA, B.B.; AKBARI, L.F. Characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* Schelecht. Causing fenugreek wilt. **International Journal of Chemical Studies**, India, v. 6, n. 2, p. 1167-1172, 2018.

CAVALCANTI, M.A.Q.; DE OLIVEIRA, L.G.; FERNANDES, M.J.; LIMA, D.D. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Brasil, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CÓRDOBA, K.A.M.; RÍOS, A.H. Biotechnological applications and potential uses of the mushroom *Trametes versicolor*. **Mycological Research**, v. 105, p. 1514–1518, 2012.

CHAGAS, M.B.O.; PRAZERES DOS SANTOS, I.; NASCIMENTO DA SILVA, L.C.; CORREIA, M.T.D.S.; MAGALI DE ARAÚJO, J.; CAVALCANTI, M.D.S.; LIMA, V.L.M. Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic Fungi Associated with *Hancornia Speciosa* Gomes Bark. **The Open Microbiology Journal**, Brazil, v. 11, p. 179-188, 2017.

DAMIANO, D. K.; DE SOUZA, G. M.; TEJADA, E. C. S.; SAENZ, C. C. B. Avaliações do DNA e do metabólito secundário produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* nas fases de crescimento. **Atlas de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 3, n. 2, 2015.

DE VRIES, R.P.; RILEY, R.; WIEBENGA, A. *et al.* Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. **Genome Biology**, Netherlands, v. 18, n. 1, p. 18-28, 2017.

DEMIR, E.; BASBÜLBÜL, G. Screening of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Products. **Biotechnology Journal**, India, v.18, n. 2, p. 1-9, 2017.

DEMBITSKY, V. M. Naturally occurring bioactive Cyclobutane-containing (CBC) alkaloids in fungi, fungal endophytes, and plants. **Phytomedicine**, Israel, v. 21, n. 12, p. 1559–1581.

DEWI, R. Isolation and Identification of *Aspergillus* Species from Wooden Fish (*Keumamah*). **Open Science**, Indonesia, v. 5, n. 3, p. 27-35, 2018.

ETAME, R.M.E.; MOUOKEU, R.S.; POUNDEU, F.S.M.; VOUKEND, I.K.; CIDJEU, C.L.P.; TIABOU, A.T.; YAYA, A.J.G.; NGANE, R.A.N.; KUIATE, J.R.; ETOA, F.X. Effect of fractioning on antibacterial activity of n-butanol fraction from *Enantia chlorantha* stem bark metanol extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Douala, v. 19, n. 1, p. 56, 2019.

FAIT, A.; SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; FERNIE, A. R. Metabolomics Approaches to Advance Understanding of Nitrogen Assimilation and Carbon-Nitrogen Interactions. **Annual Plant Reviews**, Israel, v. 42, p. 249–268, 2011.

FARBO, M.G.; URGEHE, P.P.; FIORI, S.; MARCELLO, A.; OGGIANO, S.; BALMAS, V.; HASSAN, Z.U.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, Italy, v. 284, p. 1-10, 2018.

FAN, B.; PARROT, D.; BLUMEL, M.; LABES, A.; TASDEMIR, D. Influence of OSMAC-Based Cultivation in Metabolome and Anticancer Activity of Fungi Associated with the Brown Alga *Fucus vesiculosus*. **Marine Drugs**, Germany, v. 17, n. 1, p. 67, 2019.

FENG, Z.W.; LY, M.M.; LI, X.S.; ZHANG, L.; LIU, C.X.; GUO, Z.Y.; DENG, Z.S.; ZOU, K.; PROKSCH, P. Penicitoamide, an Antimicrobial Metabolite with High Carbonylization from the Endophytic Fungus *Penicillium* sp. (NO. 24). **Molecules**, China, v. 21, n. 11, p. 14-38, 2016.

FENG, C.; WEI, Q.; HU, C.; ZOU, Y. Biosynthesis of Diphenyl Ethers in Fungi. **Organic Letters**, China, v. 21, n. 9, p. 3114-3118, 2019.

FLOREA, S.; PANACCIONE, D.G.; SCHARDL, C.L. Ergot Alkaloids of the Family Clavicipitaceae. **Phytopathology**, Morgantown, v. 107, n. 5, p. 504–518, 2017.

FLORES, C.; FOUQUET, G.; MOURA, I.C.; MACIEL, T.T.; HERMINE, O. Lessons to Learn From Low-Dose Cyclosporin-A: A New Approach for Unexpected Clinical Applications. **Frontiers in Immunology**, France, v. 10, n. 588, 2019.

FRANK, M.; ÖZKAYA, F.C.; MULLER, W.E.G.; HAMACHER, A.; KASSACK, M.U.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Cryptic Secondary Metabolites from the Sponge-Associated Fungus *Aspergillus ochraceus*. **Marine Drugs**, Germany, v. 17, n. 2, 99, 2019.

GANEO, A.L.; CÂNDIDO, L.; AIRES DOS SANTOS, J. *et al.* Células: uma breve revisão sobre a diversidade, características, organização, estruturas e funções celulares. **Unisanta Bioscience**, Brasil, v. 8, n. 4, p. 457-465, 2019.

GOMES, C.C.; PINTO, L.C.C.; VICTOR, F.L.; SILVA, E.A.; RIBEIRO, A.; SARQUIS, M.I.; CAMÕES, I.C. *Aspergillus* in endodontic infection near the maxillary sinus. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, Brazil, v. 81, n. 5, p. 527–532, 2015.

GONZÁLEZ, G. D. T.; SIGRIST, R.; PAULO, B. S. Avanços Recentes na Manipulação Genética de organismos para a produção de peptídeos não-ribossomais. *Revista Virtual de Química*, Brasil, v. 8, n. 6, 2016.

GHANTE, P.H.; KANASE, K.M.; KALE, S.P.; CHAYAN, R.L.; SHARMA, K.M.; GHUGE, S.B. Cultural, Morphological and Molecular Variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *udum* Isolates by RAPD Method. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, India, v. 7, n. 10, p. 2109-2122, 2018.

HARRIS, S.D. Hyphal branching in filamentous fungi. **Developmental Biology**, Canada, v. 451, n. 1, p. 35-39, 2019.

HANDA, C.L.; DE LIMA, F.S.; GUELFY, M.F.G.; FERNANDES, M.D.S.; GEORGETTI, S.R.; IDA, E.I. Parameters of the fermentation of soybean flour by *Monascus purpureus* or *Aspergillus oryzae* on the production of bioactive compounds and antioxidante activity. **Food Chemistry**, Brazil, v. 271, p. 274-283, 2019.

HAUTBERGUE, T.; JAMIN, E.L.; DEBRAUWER, L.; PUEL, O.; OSWALD, I.P. From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. **Natural Products Reports**, France, v. 35, n. 2, p. 147-173, 2018.

ISHIKAWA, F.; TANABE, G.; KAKEYA, H. Activity-Based Protein Profiling of Non-ribosomal Peptide Synthetases. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Japan, v. 420, p. 321–349, 2019.

JAMIL, T.; ASGHAR, M.; HUSAIN, F.; BHATTI, H.N. Production Enhancement of Lovastatin Using Strategies of Screening and Response Surface Optimization in Solid State Fermentation. **Punjab University Journal of Zoology**, Pakistan, v. 33, n. 2, p. 169-175, 2018.

KANKAM, F.; QIU, H.; PU, L.; LONG, H.; ZHANG, C.; HE, J.; ZHANG, H. Isolation, Purification and Characterization of Phytotoxins Produced by *Rhizoctonia solani* AG-3, the Cause Agent of Potato Stem Canker. **American Journal of Potato Research**, China, v. 93, n. 4, p. 321–330, 2016.

KAWAKAMI, A.; NAKAJIMA, T.; HIRAYAE, K. Effects of carbon sources and amines on induction of trichothecene production by *Fusarium asiaticum* in liquid culture. **FEMS Microbiology Letters**, Japan, v. 352, n. 2, p. 204-12, 2014.

LI, W.; DING, L.; WANG, N.; XU, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.; HE, S.; WU, B.; JIN, H. Isolation and Characterization of Two New Metabolites from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus* sp. LS34 by OSMAC Approach. **Marine Drugs**, China, v. 17, n. 5, p. 283, 2019.

LI, Y.F.; WU, X.B.; NIAZ, S.I.; ZHANG, L.H.; HUANG, Z.J.; LIN, Y.C.; LI, J.; LIU, L. Effect of culture conditions on metabolites produced by the crinoid-derived fungus *Aspergillus ruber* 1017. **Natural Product Research**, China, v. 31, n. 11, p. 1299-1304, 2016.

MATUSZEWSKA, A.; JASZEK, M.; STEFANIUK, D.; CISZEWSKI, T.; MATUSZEWSKI, Ł. Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. **PLoS One**, Poland, v. 13, n. 6, p. 1-14, 2018.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; SANTOS, S.A.; BERND, L.A. Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasil, v. 44, n. 5, p. 269-72, 2002.

MOUSSA, M.; EBRAHIM, W.; BONUS, M.; GOHLKE, H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; HARTMANN, R.; KALSCHUEER, R.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers. **RSC Advances**, Germany, v. 9, n. 3, p. 1491–1500, 2019.

NADUMANE, V.K.; VENKAT, P.; PAL, A.; DHAROD, H.; SHUKLA, M.; PRASHANTHI, K. A Novel Metabolite from *Aspergillus ochraceus* JGI 25 Showing Cytotoxicity to Hela Cells. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, Germany, v. 75, n. 5, p. 507-14, 2013.

NARANJO-ORTIZ, M.A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Spain, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019.

NASCIMENTO, A.M.; CONTI, R.; TURATTI, I.C.C.; CAVALACANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; MANFRIM, V.; TOLEDO, J.S.; CRUZ, A.K.; PUPO, M.T. Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brazil, v. 22, n. 6, p. 1276–1281, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, United States, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

NICOLETTI, R.; VINALE, F. Bioactive Compounds from Marine-Derived *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and *Trichoderma* Species. **Marine Drugs**, Italy, v. 16, n. 11, p. 408, 2018.

NIRMALADEVI, D.; VENKATARAMANA, M.; SRIVASTAVA, R.K.; UPPALAPATI, S.R.; GUPTA, V.K.; YLI-MATTILA, T.; CLEMENT TSUI, K.M.; SRINIVAS, C.; NIRANJARA, S.R.; CHANDRA, N.S. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. **Scientific Reports**, Indian, v. 6, p. 21367, 2016.

NOWROUSIAN, M. Genomics and transcriptomics to study fruiting body development: An update. **Fungal Biology Reviews**, Germany, v. 32, n. 4, p. 231-235, 2018.

ÖZKAYA, F.C.; EBRAHIM, W.; EL-NEKETI, M.; TANSEL TANIKUL, T.; KALSCHUEER, R.; MULLER, W.E.G.; GUO, Z.; ZOU, K.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Induction of new metabolites from sponge-associated fungus *Aspergillus carneus* by OSMAC approach. **Fitoterapia**, Germany, v. 131, p. 9-14, 2018.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. **Frontiers in Microbiology**, China, v. 10, n. 294, 2019.

PANDEY, N.; JAIN, R.; PANDEY, A.; TAMTA, S. Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium* sp. (GBPI_P155) isolated from mountain ecosystem. **Mycology**, India, v. 9, n. 2, p. 81-92, 2018.

PARK, M.S.; CHUNG, D.; BAEK, K.; LIM, Y.W. Three Unrecorded Species Belonging to *Penicillium* Section Sclerotiora from Marine Environments in Korea. **Mycobiology**, Korea, v47, n. 2, p. 165-172, 2019.

PASSADOR, M.M.; PIRES, G.C.C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biology**, Brasil, v. 72, n. 1, 2010.

PASTRE, R. M.; ANDREY, M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871.

PAULO, B. S.; SIGRIST, R.; OLIVEIRA, L. G. de. Avanços Recentes em Biossíntese Combinatória de Policetídeos: Perspectivas e Desafios. **Química Nova**, São Paulo , v. 42, n. 1, p. 71-83, 2019 .

PEYRAT, L.A.; TSAFANTAKIS, N.; GEORGOUSAKI, K.; OUZZANI, J.; GENILLOU, O.; TROUGAKOS, I.P.; FOKIALAKIS, N. Terrestrial Microorganisms: Cell Factories of Bioactive Molecules with Skin Protecting Applications. **Molecules**, Athens, v. 24, n. 9, p. 1836, 2019.

PINOTTI, M.M.Z.; SANTOS, J.C.P.; KLAUBERG FILHO, O.; MICHELLUTI, D.J.; CASTRO, D.R.L. Isolamento de Fungos de Solo Associados a culturas de Amora, Framboesa e Mirtilo no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Brasil, v. 6, n. 1, p. 67-80, 2011.

POWERS-FLETCHER, M.V.; KENDALL, B.A.; GRIFFIN, A.T.; HANSON, K.E. Filamentous Fungi. **Microbiology Spectrum**, Germany, v. 4, n. 3, p. , 231-235, 2016.

QIN, W.T.; ZHUANG, W.Y. Seven wood-inhabiting new species of the genus *Trichoderma* (Fungi, Ascomycota) in Viride clade. **Scientific Reports**, China, v. 6, n. 27074, 2016.

RAGHAVA RAO, K.V.; MANI, P.; SATYANARAYANA, B.; RAGHAVA RAO, T. Purification and structural elucidation of three bioactive compounds isolated from *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 and their biological activity. **Biotech**, India, v. 7, n. 1, p.24, 2017.

RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S.M. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, India, v. 60, 2017.

RASMUSSEN, S.; PARSONS, A.J.; JONES, C.S. Metabolomics of forage plants: a review. **Annals of Botany**, United Kingdom, v. 110, p. 1281–1290, 2012.

ROMANO, S.; JACKSON, S.A.; PATRY, S.; DOBSON, A.D.W. Extending the "One Strain Many Compounds" (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. **Marine Drugs**, Austria, v. 16, n. 7, 244, 2018.

SANCHEZ, J.F.; WANG, C.C. The chemical identification and analysis of *Aspergillus nidulans* secondary metabolites. **Methods in Molecular Biology**, United States, v. 944, p. 97–109, 2012.

SAKR, N. (2018). Evaluation of two storage methods for fungal isolates of *Fusarium sp.* and *Cochliobolus sativus*. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, Brazil, v. 53, n. 1, p. 11–18, 2018.

SCOPEL, M.; MOTHES, B.; LERNER, C.B.; HENRIQUES, A.T.; MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Arvoredol—An unusual chlorinated and biofilm inhibiting polyketide from a marine *Penicillium* sp. of the Brazilian coast. **Phytochemistry Letters**, Brazil, v. 20, p. 73–76, 2017.

STEINBERGUE, G.; PENÁLVA, M.A.; RIQUELEME, M.; WOSTEN, H.A.; HARRIS, S.D. Cell Biology of Hyphal Growth. **Microbiology Spectrum**, Netherlands, v. 5, n 2, 2017.

SILVA, A.L.; SERRA, E.F.; RIPOLL, M.K.; WALLER, S.B.; MARTINS, O.A.; HUGEN, G.F.G.P.; DE FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A. Viabilidade de isolados de *Malassezia pachydermatis* e *Rhodotorula* spp. mantidos em água destilada. **Pubvet**, Brasil, v. 13, n. 11, p. 1-4, 2019.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. M.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, Brasil, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SINGH, M.; CHAUDHARY, S.; SAREEN, D. Non-ribosomal peptide synthetases: Identifying the cryptic gene clusters and decoding the natural product. **Journal of Biosciences**, India, v. 42, n. 1, p. 175–187, 2017.

TAKAHASHI, J.A.; LIMA, G.S.; DOS SANTOS, G.F.; LYRA, F.H.; DA SILVA-HUGHES, A.F.; GONÇALVES, F.A.G. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 9, n. 6, 2017.

- TAN, Y.; YANG, B.; LIN, X.; LUO, X.; PANG, X.; TANG, L.; LIU, Y.; LI, X.; ZHOU, X. Nitrobenzoyl Sesquiterpenoids with Cytotoxic Activities from a Marine-Derived *Aspergillus ochraceus* Fungus. **Journal of Natural Products**, China, v. 81, n. 1, p. 92-97, 2018.
- TANG, J.; QIAN, Z.; WU, H. Enhancing cordycepin production in liquid static cultivation of *Cordyceps militaris* by adding vegetable oils as the secondary carbon source. **Bioresource Technology**, China, v. 268, p. 60–67, 2018.
- THAWABTEH, A.; JUMA, S.; BADER, M.; KARAMAN, D.; SCRANO, L.; BUFO, S.A.; KARAMAN, R. The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. **Toxins**, Palestine, v. 11, n. 11, 2019.
- TOM, H.A.; UCCIFERRI, L.; ROSS, A.C. Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production. **Journal in Industrial Microbiology and Biotechnology**, Canada, v. 46, n. 9, p. 1381-1400, 2019.
- TCHOUKOUA, A.; HASEGAWA, R.; HENDRACIPTA, K.A.; SATO, S.; KOSEKI, T.; SHIONO, Y. Structure elucidation of new fusarielins from *Fusarium* sp. and their antimicrobial activity. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Japan, v. 56, p. 32-36, 2018.
- VAISHNAV, P.; DEMAIN, A.L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, India, v. 29, n. 2, p. 223–229, 2010.
- VANDERMOLEN, K.M.; RAJA, H.A.; EL-ELIMAT, T.; OBERLIES, N.H. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, United States of America, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.
- VENKATACHALAM, M.; ZELENA, M.; CACCIOLA, F.; CESLOVA, L.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; CLERC, P.; DUGO, P.; MODELLO, L.; FOUILLAUD, M.; ROTONDO, A.; GIUFFRIDA, D.; DUFOSSÉ, L. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. **Journal of Food Composition and Analysis**, France, v. 67, p. 38–47, 2018.
- VIEIRA, D.G.; SILVA, R.M.; SILVA, O.F.; FONSECA, M.J.O.; SOARES, A.G.; COSTA, R.A. Crescimento in Vitro de fungos (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Cladosporium cladosporioides*) isolados de frutos do mamoeiro, sob atmosfera controlada e refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Brasil, v. 28, n. 3, p. 387-390, 2006.

WANG, Q.; YANG, X.Q.; MIAO, C.P.; XU, L.H.; DING, Z.T.; YANG, Y.B.; ZHAO, L.X. A New Pair of Pentaketide Diastereoisomers from *Aspergillus melleus* YIM PHI001. **Records of Natural Products**, China, v. 12, n. 3, p. 216-221, 2018.

YADAV, A.N. Endophytic Fungi for Plant Growth Promotion and Adaptation under Abiotic Stress Conditions. **Acta Scientific Agriculture**, India, v. 3, n. 1, p. 91-93, 2019.

YING, Y.M.; HUANG, L.; TIAN, T.; LI, C.Y.; WANG, S.L.; MA, L.F.; ... Zhan, Z.-J. Studies on the Chemical Diversities of Secondary Metabolites Produced by *Neosartorya fischeri* via the OSMAC Method. **Molecules**, China, v. 23, n. 11, p. 2772, 2018.

YUE, Y.; YU, H.; LI, R.; XING, R.; LIU, S.; LI, P. Exploring the Antimicrobial and Antifungal Potential of Jellyfish-Associated Marine Fungi by Cultivation-Dependent Approaches. **Plos One**, China, v. 10, p. 12-0144, 2015.

ZERMEÑO, M.A.A.; GALLOU, A.; PADILLA, A.M.B.; MICHEL, G.Y.A.; RODRIGUÉZ, J.C.R.; BEMAL, H.C.A.; MATÍAS, R.M. Viability, purity and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, México, v. 21, n. 111, p. 920-928, 2017.

ZOTTI, M.; AGNOLETTI, A.F.; VIZZINI, A.; COZZANI, E.; PARODI, A. Onychomycosis from *Aspergillus melleus* a Novel Pathogen for Humans. Fungal Identification and in vitro Drug Susceptibility. **Experimental Dermatology**, Italy, v. 24, p. 966–982, 2015.

ZUTZ, C.; BACHER, M.; PARICH, A.; KLUGER, B.; GACEK-MATTEWS, A.; SCHUMACHER R.; WAGNER, M.; RYCHLI, K.; STRAUSS, J. Valproic Acid Induces Antimicrobial Compound Production in *Doratomyces microspheres*. **Frontiers in Microbiology**, Austria, v. 7, p. 510, 2016.

ZHANG, Z.; HE, X.; CHE, Q.; ZHANG, G.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Sorbicillasins A–B and Scirpyrone K from a Deep-Sea-Derived Fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. **Marine Drugs**, China, v. 16, n. 7, p. 245, 2018.

ZHANG, Y.; HAN, T.; MING, Q.; WU, L.; RAHMAN, K.; QIN, L. Alkaloids produced by endophytic fungi: a review. **Natural Product Communications**, Shanghai, v. 27, n. 7, p. 963–968, 2012.

ANEXO I

Tabela 3. Identificação morfológica dos 27 fungos filamentosos incorporados a coleção.

Código	Identificação da cepa
H6-1	<i>Aspergillus</i> sp.
H31	<i>Aspergillus</i> sp.
H6-2	<i>Aspergillus</i> sp.
HS4	<i>Aspergillus</i> sp.
HSUC-6	<i>Penicillium maximae</i>
IS-9	<i>Fusarium oxysporum</i>
IS-6	<i>Aspergillus</i> sp.
IS-7	<i>Aspergillus</i> sp.
TPP 1.1	<i>Aspergillus</i> sp.
JS-5	<i>Aspergillus</i> sp.
TPP 1.2	<i>Aspergillus</i> sp.
HS2	<i>Aspergillus</i> sp.
IS-13	<i>Aspergillus</i> sp.
TPP 1.3	<i>Aspergillus</i> sp.
1.1	<i>Aspergillus</i> sp.
2.1	<i>Aspergillus</i> sp.
2.4	<i>Colletotrium</i> sp.
2.5	<i>Aspergillus</i> sp.
5.3	<i>Aspergillus</i> sp.
5.5	<i>Aspergillus</i> sp.
8.5	<i>Curvularia</i> sp.
6.1	<i>Aspergillus</i> sp.
7.1	<i>Aspergillus</i> sp.
7.3	<i>Aspergillus ochraceus</i>
7.4	<i>Aspergillus melleus</i>
8.2	<i>Fusarium equiseti</i>
8.4	<i>Penicillium rolfsii</i>

ANEXO II

Fluxograma 1. Fluxograma das metodologias utilizadas no estudo.