

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

NATHASHA FERNANDES DE OLIVEIRA

EFEITOS DE FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
COLORANTES E ANTIBIÓTICOS POR FUNGOS *Trichoderma* spp.

MANAUS

2021

NATHASHA FERNANDES DE OLIVEIRA

EFEITOS DE FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
COLORANTES E ANTIBIÓTICOS POR FUNGOS *Trichoderma* spp.

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde.

Orientador: Dr. Luiz Antonio de Oliveira

MANAUS

2021

Ficha Catalográfica

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

O48e Oliveira, Nathasha Fernandes de
Efeitos de fatores físico-químicos na produção de biomassa,
colorantes e antibióticos por fungos *Trichoderma* spp. / Nathasha
Fernandes de Oliveira . 2021
134 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luiz Antonio de Oliveira
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. *Trichoderma* sp.(Fungo). 2. Fungo. 3. Colorante. 4. Biomassa.
5. Antibiótico. I. Oliveira, Luiz Antonio de. II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

NATHASHA FERNANDES DE OLIVEIRA

EFEITOS DE FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
COLORANTES E ANTIBIÓTICOS POR FUNGOS *Trichoderma* spp.

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde.

Aprovado em 08/03/2021:

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Luiz Antonio de Oliveira

Dra. Larissa Kirsch Barbosa

Dra. Priscila Pauly Ribas

AGRADECIMENTOS

Agradecer é o ato mais belo da alma humana, ao realizá-lo reconhecemos que sem o outro não somos nada, dependemos uns dos outros, em qualquer momento, em qualquer condição. Devido a isso, gostaria de agradecer inicialmente a Deus, a força da minha vida, que permitiu que eu vivesse inúmeras dificuldades para o meu amadurecimento e aprendizado, sem nunca me abandonar, trouxe verdadeiros anjos ao meu encontro, iluminou corações que me levantaram quando pensei não poder mais, minha diária e eterna gratidão.

Ao meu orientador, agradeço por ter me aceitado, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, pela paciência, pelos lanches, pelas orientações, por sempre estar presente e trabalhando pelo desenvolvimento da Ciência e Tecnologia na Amazônia, que Jesus o ilumine sempre. Aos meus pais, meus primeiros anjos e professores, difícil escrever sem as lágrimas tentarem atrapalhar, nem acho que o meu vocabulário seja suficiente, porém não posso deixar de tentar.

Mãe, jamais terei como agradecer por todo o seu sacrifício no INPA, no trânsito, na correria durante toda a graduação, no mestrado não foi diferente. Seu apoio foi fundamental; todos os conselhos, todos os abraços, nos momentos de desespero, seus lanches, suas ideias, suas palavras de incentivo, sem contar a inspiração de mulher e profissional que a senhora sempre foi para mim, entre outros atos de imenso amor. Te amo muito, gratidão eterna, ficar longe da senhora é difícil, pois nessa reta final, por vezes quis o seu abraço, mas obrigada por torcer por mim, por sua força, suas lágrimas, suas palavras, ajudaram a me sustentar, quando eu só queria que tudo acabasse, quando as forças me faltaram. Deus não poderia ter me enviado uma mãe melhor, lhe prometo que com ou sem títulos, serei um sucesso, pois buscarei fazer a diferença no mundo como a senhora faz e ter o seu nível de competência profissional, assim como ser um grande ser humano, olhando sempre para os mais sofredores como a senhora olha, e uma grande mãe como a senhora é e sempre será pra mim. Obrigada por todas as orações.

Pai, também nunca terei como agradecer por tantos sacrifícios, quantos dias difíceis, quantos quilômetros caminhados, pelo meu bem-estar, quantos estresses para nunca me deixar faltar nada, quantos cafés da manhã preparados com tanto carinho e amor, por tantas idas ao INPA nos horários mais absurdos, por fazer de tudo por mim e, principalmente, agradeço a Deus por ter me enviado um pai com tanto talento para a limpeza. Sua competência me impressiona, seu nível de profissionalismo, seu esforço em sempre ser melhor, em fazer o seu trabalho da melhor forma possível e da forma mais correta, se mantendo íntegro sempre. O senhor é muito amor, esforço e dedicação, mesmo no seu jeito sério e reservado, espero ser uma filha a seu nível de pai e que o Matheus seja um 1/3 de pai

que o senhor é e sempre vai ser pra mim. Eu te amo muito, conte sempre comigo perto, mesmo morando longe, mesmo nas nossas diferenças, o senhor é um herói pra mim.

Ao meu marido e seus familiares, muito obrigada por tudo. Meu amor, você que me acompanhou nessa jornada, me fornecendo todo o apoio, amor, dedicação e proteção, eu não tenho como agradecer por todos os seus sacrifícios. Você realizou um grande sonho meu, que foi o de amar intensamente alguém, o de sentir o olho brilhar, mas mais do que amar, me ensinou e ensina a ser melhor a cada dia. Você é um grande companheiro, um homem que eu admiro, que é perseverante, que luta, que acredita na educação como poder transformador, é tão especial e importante na minha vida que nem sei explicar, apenas te amar. Te agradeço infinitamente por ser esse homem maravilhoso, você aguentou tanta coisa, todos os meus dramas, domingos ocupados e choros, te amo e te quero para a eternidade.

Girls of Lab (Glaucia, Janaína, Luana, Nadionara, Thaíssa) and Carlos, como agradecer, lágrimas de gratidão sempre querem escorrer nesse momento, não existem palavras, presentes ou qualquer atitude minha que seja suficiente para expressar a minha gratidão. Mas não tenho como não destacar algumas situações em particular. Thaíssa, você não é uma cristã só da boca para fora, você é cristã de alma, caridade corre no seu sangue, ousou te chamar de amiga, mas nem sei se mereço. Você me ajudou nos experimentos de uma forma que nunca vou conseguir te devolver a altura, mas vou me esforçar, muito obrigada, de toda a minha alma e meu coração, quem planta, colhe e sua colheita será celestial, eu não tenho dúvidas. Obrigada por todo o seu carinho, amizade, apoio, incentivo, por me escutar e me aceitar como sou. Te admiro muito, nossa não aceito menos que total sucesso vindo de você, competência é o seu sobrenome, uma das farmacêuticas mais incríveis que já conheci, voa Thaíssa, para bem longe do seu ninho, você merece conquistar o mundo.

Glaucia, que grande pesquisadora, que mãe incrível e que amiga fenomenal você é, te agradeço profundamente por todas as conversas, palavras de apoio e por ter me ajudado tanto nessa reta final, muito obrigada, já quero o seu minicurso sobre produção de slides (é sério). Te admiro muito, se eu for 1/3 da mãe que você é, sei que vencerei na vida, jamais seu filho lhe atrapalhou como muitos dizem. Na verdade, ele lhe fortaleceu e lhe tornou aquele fenômeno na defesa, lhe forneceu o título que nem o túmulo é capaz de tirar e que lhe dará muito mais pontos no céu que qualquer título acadêmico. Obrigada por ser um grande exemplo pra mim, pessoal e profissional, e espero que possamos levar essa amizade para toda a vida, quero ver o Arthur ser um sucesso tão grande como você é e será ainda, afinal o céu é o seu limite.

Nara, que loucura essa sua luta pelo seu crescimento profissional, eu não seria tão forte como você, mesmo com inúmeros problemas, você sempre batalhou de todas as formas que podia, eu tenho certeza que você é o orgulho da sua família e, para mim, ousou chamar

de amiga. Te agradeço por todas as conversas, por me procurar e se preocupar quando eu estava mal e por seu empenho em me ajudar, mesmo diante de mil tarefas, certeza que você será um grande sucesso. Não esquece de voar bem alto, saia sempre da sua zona de conforto, não aceite menos nem se conforme o que tem atualmente, você merece muito mais, quero ver Nara orientadora, Nara pesquisadora ou o que você deseja ser, você merece o topo.

Janaína, obrigada por tudo, com você aprendi muito, somos bem diferentes, mas são as diferenças que nos unem e nos fazem evoluir. Admiro sua perseverança para alcançar seus sonhos e para cuidar de seus amores, me ensinastes sobre paciência, sobre amor e sobre o que vale a pena lutar. Busque ser melhor a cada dia, mas conserve a luta pelo que é certo, isso é muito precioso e está em falta hoje em dia. Desejo que todos os seus sonhos se realizem e, por favor, não esquece de guardar um cantinho na sala para mim, quando você se mudar para a Espanha, vou te visitar rs. Carlos, você é um profissional excelente, obrigada pelas conversas, explicações, companheirismo, você vai voar longe também.

Aos meus amigos de fora do laboratório pela torcida, amor e apoio incondicional, especialmente a Juliana Amaral, que me acompanhou, mesmo a distância, sempre me dando força e me ajudando a sorrir diante das tribulações, ter uma melhor amiga é um presente divino. Não poderia deixar de citar Erick Frota e Gabriel Oliveira, farmacêuticos de sucesso, que me inspiram pela sua dedicação, competência e amor ao ofício. Katy, obrigada pelas antigas conversas antes de dormir, além do apoio e do carinho de sempre, desejo sucesso em dobro para você. Agradeço aos servidores públicos Francisco e a Mirna pelos serviços prestados, todos os alunos precisam muito de vocês diariamente, assim como ao Augusto, por ter permitido o uso de vários equipamentos, pela paciência e por explicar como usá-los. À Neidilê Munhoz, por ter me auxiliado com a indicação do liofilizador na Embrapa. Ao Dr. Gilvan, por ter me permitido utilizar o liofilizador e à maravilhosa Dra. Karina por ter me atendido com tanto carinho, vocês salvaram a minha vida.

Ao Dr. Adalberto Val, à Dra. Nazaré e ao Dr. Renam por terem me recebido para o uso do espectrofotômetro, infelizmente não foi possível usar os resultados desse dia, mas agradeço o tempo disponibilizado, assim como agradeço à Dra. Cecilia, todos do INPA, por terem me recebido e tirado minhas dúvidas. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa, ao INPA, à UFAM e ao PPGBIOTEC-UFAM, na pessoa do Prof^o. Edmar, pela oportunidade do estudo e da realização da pesquisa e a FIOCRUZ, na pessoa da Prof^a Ormezinda, pelos fungos e bactérias. Se esqueci alguém, peço desculpas, mas sou eternamente grata a todos que me auxiliaram, de forma direta ou indireta. Que Deus abençoe a todos. Gratidão.

RESUMO

Cada vez mais o consumidor exige das indústrias o uso de colorantes naturais benéficos ao corpo humano e ao meio ambiente. Os colorantes de origem microbiana possuem a vantagem de não serem sazonais e de uma produção mais rápida. Outro problema enfrentado pela sociedade é o problema da resistência bacteriana. Apesar da falta de lucro desejado pela indústria ao serem lançados antibióticos, a população clama por novas opções terapêuticas, da mesma forma que são necessárias mudanças comportamentais quanto ao uso dos antibióticos. Diante desse cenário, torna-se de suma importância pesquisas direcionadas à investigação de possíveis colorantes e antibióticos, principalmente, de origem microbiana. Dessa forma, utilizou-se cinco cepas de *Trichoderma spp.* em cultivos submersos, com variação das condições de cultivo de forma univariada, com posterior filtração. Em seguida, realizou-se a análise da produção da biomassa (Peso de massa seca) e do colorante, por meio de um espectrofotômetro. Posteriormente, avaliou-se a atividade antibacteriana dessas cepas contra *E. coli* CBAM 0001, *B. cereus* CBAM 0549, *K. pneumoniae* CBAM 0672 e *P. aeruginosa* CBAM 0665. Inicialmente, aplicou-se o Método de Gelose na seleção dos fungos. A partir dos filtrados da cepa selecionada no teste anterior empregou-se um método adaptado em microplaca de 96 poços, com intuito de selecionar quatro filtrados para prosseguirem para a análise da Concentração Mínima Inibitória (CMI). Alusivo a produção de biomassa, a temperatura, a temperatura que mais estimulou a produção foi 27°C, com uma média do peso da massa seca de 0,66 g/100 ml, quanto ao pH foi o pH 5,5, com 0,71 g/100ml, e quanto ao nível de exposição à luz classificado como muita luz, com 0,74 g/100ml. Em relação a produção de colorantes, a temperatura que mais estimulou também foi 27°C, com média de 4,48 UA, e o nível de exposição a luz também foi muita luz, com média de 5,07 UA. Porém, no pH já foram os pHs 6,5 e 7,5, com médias de 5,21 UA e 4,93UA. Relativo à atividade antimicrobiana, na etapa de triagem o *Trichoderma virens* CFAM 1144 apresentou atividade contra três dos patógenos testados: *Escherichia coli* CBAM 0001, *Bacillus cereus* CBAM 0549 e a *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 0665, enquanto que o *Trichoderma sp.* CFAM 1162 apresentou atividade para duas dessas bactérias: *E.coli* CBAM 0001, *B.cereus* CBAM 0549. Dessa forma, o CFAM 1144 foi selecionado. Eles seguiram para análise dos filtrados nas microplacas, quando 4 dos filtrados foram escolhidos: 37°C, Muita luz, pouca luz e pH 6,5. No entanto, ao ser realizada a CMI, os filtrados mostraram não ter mais atividade antibacteriana, uma vez que todas as bactérias se mostraram resistentes. Os resultados obtidos indicam que as condições de cultivo precisam ser adaptadas ao objetivo do trabalho e dos microrganismos a serem utilizados. Nenhuma das cepas conseguiu crescer ou produzir colorante a 47°C. Quanto a atividade antibacteriana, o *Trichoderma virens* CFAM 1144 foi o fungo mais promissor.

Palavras-chave: *Trichoderma sp.* Fungo. Colorante. Biomassa. Antibiótico.

ABSTRACT

Consumers are increasingly demanding from industries the use of natural dyes beneficial to the human body and the environment. Colorants of microbial origin have the advantage of not being seasonal and of a faster production. Another problem faced by society is the problem of bacterial resistance. Despite the lack of profit desired by the industry when antibiotics are launched, the population calls for new therapeutic options, in the same way that behavioral changes regarding the use of antibiotics are necessary. In view of this scenario, research directed to the investigation of possible dyes and antibiotics, mainly of microbial origin, becomes extremely important. Thus, five strains of *Trichoderma* spp. in submerged crops, with univariate variation in cultivation conditions, with subsequent filtration. Then, the analysis of biomass production (dry mass weight) and colorant was performed using a spectrophotometer. Subsequently, the antibacterial activity of these strains was evaluated against *E. coli* CBAM 0001, *B. cereus* CBAM 0549, *K. pneumoniae* CBAM 0672 and *P. aeruginosa* CBAM 0665. Initially, the Gelose Method was applied in the selection of fungi. From the filtrates of the strain selected in the previous test, a method adapted in a 96-well microplate was used, in order to select four filtrates to proceed with the analysis of the Minimum Inhibitory Concentration (CMI). Alluding to the biomass production, the temperature that most stimulated the production was 27°C, with an average dry mass weight of 0.66 g / 100 ml, as for the pH it was pH 5.5, with 0.71 g / 100ml, and regarding the level of exposure to light classified as very light, with 0.74 g / 100ml. Regarding the production of colorants, the temperature that stimulated the most was also 27°C, with an average of 4.48 AU, and the level of exposure to light was also a lot of light, with an average of 5.07 AU. pHs 6.5 and 7.5, with averages of 5.21 AU and 4.93UA. Regarding antimicrobial activity, in the screening stage, *Trichoderma virens* CFAM 1144 showed activity against three of the pathogens tested: *Escherichia coli* CBAM 0001, *Bacillus cereus* CBAM 0549 and *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 0665, while *Trichoderma* sp. CFAM 1162 showed activity for two of these bacteria: CBAM 0001 e CBAM 0549. Thus, CFAM 1144 was selected. They proceeded to analyze the filtrates in the microplates, when 4 of the filtrates were chosen: 37°C, Too much light, too little light and pH 6.5. However, when the IMC was performed, the filtrates were shown to have no antibacterial activity, since all the bacteria were resistant. The results obtained indicate that the culture conditions need to be adapted to the objective of the work and the microorganisms to be used. None of the strains managed to grow or produce colorant at 47°C. Regarding antibacterial activity, *Trichoderma virens* CFAM 1144 was the most promising fungus.

Keywords: *Trichoderma* sp. Fungus. Colorant. Biomass. Antibiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Espectro Eletromagnético com destaque na região visível	18
Figura 2-Possibilidades da percepção da cor e o Disco ou Roda de Cores	20
Figura 3-Processo da formação da mesma cor em objetos opacos e transparentes	21
Figura 4-Ordem cronológica das descobertas de alguns antibióticos e dos primeiros relatos de resistência bacteriana de cada um.....	43
Figura 5-Imagens macroscópicas e microscópicas de colônias de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> sp.....	58
Figura 6-Fase assexuada dos fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp.....	59
Figura 7-Colônias de <i>Trichoderma</i> spp. cultivadas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), por 5 dias e com luz 24 horas/dia	70
Figura 8-Meios de cultura (Caldo BD) fermentados pelas 5 cepas <i>Trichodermas</i> spp. selecionados.....	71
Figura 9-Processo de filtração a vácuo de meios de cultura fermentados por diferentes fungos	72
Figura 10- Figura Esquemática das microplacas de 96 poços utilizadas na determinação da atividade antibacteriana dos filtrados de <i>Trichoderma</i> spp. oriundos de diferentes condições de cultivo	79
Figura 11-Figura Esquemática das microplacas de 96 poços utilizadas na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 4 filtrados selecionados do <i>Trichoderma virens</i> CFAM-1144	82
Figura 12-Filtrados do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210.....	99
Figura 13-Filtrados do fungo <i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144.....	100
Figura 14-Filtrados do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162.....	101
Figura 15-Filtrados do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 792.....	102
Figura 16-Filtrados do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163.....	103
Figura 17- Placas da avaliação antibacteriana pelo Método do Bloco de Gelose de cepas do <i>Trichoderma</i> spp contra a bactéria <i>E. coli</i> CBAM 0001	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Principais mecanismos de ação antibiótica	34
Tabela 2-As 20 Culturas de Fungos <i>Trichoderma</i> spp. pré-selecionadas para o estudo.....	68
Tabela 3-Variação das condições dos cultivos submersos das cepas de <i>Trichoderma</i> spp. selecionadas para o estudo	71
Tabela 4-Amostras clínicas de bactérias utilizadas nos testes de atividade antibacteriana dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	74
Tabela 5-Esquema de Preenchimento dos poços das microplacas da Atividade antibacteriana (Adaptado do Método de Microdiluição).....	78
Tabela 6-Esquema de Preenchimento dos poços das microplacas para a avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	81
Tabela 7 - Efeito das diferentes temperaturas na produção de biomassa (Peso da Massa Seca) de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp.	85
Tabela 8- Efeito dos diferentes pHs na produção de biomassa (Peso da Massa Seca) de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp.	87
Tabela 9-Efeito de diferentes níveis de exposição a luz na produção de biomassa (Peso da Massa Seca) de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp.	90
Tabela 10-Efeito de diferentes temperaturas na produção de colorantes de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp. expressos em Unidade de Absorbância (400nm)	93
Tabela 11-Efeito de diferentes pHs na produção de colorantes de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp. expressos em Unidade de Absorbância (400nm)	95
Tabela 12-Efeito das níveis de exposição a luz na produção de colorantes de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp. expressos em Unidade de Absorbância (400nm)	97
Tabela 13-Resultados do teste do bloco de gelose de fungos <i>Trichoderma</i> spp. contra bactérias patogênicas com os diâmetros dos halos de inibição produzidos.	105
Tabela 17-Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos Filtrados do <i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144 contra 4 patógenos humanos significativos.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AO	Agar Oatmeal
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BDA	Ágar Batata Dextrose
BD	Caldo Batata Dextrose
CBAM	Coleção de bactérias da Amazônia – Fiocruz - Amazonas
CFAM	Coleção de fungos da Amazônia – Fiocruz - Amazonas
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller-Hinton
CMI	Concentração Inibitória Mínima
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PABA	Ácido paraminobenzoico
PDA	Potato dextrose Agar
<i>T. harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>T. virens</i>	<i>Trichoderma virens</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
6PP	6-pentil-pirona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Colorantes	18
3.1.1 Cor.....	18
3.1.2 Corantes x Pigmentos.....	22
3.1.3 Naturais x Sintéticos	23
3.2 Antibióticos	30
3.2.1 Características Gerais.....	30
3.2.2 Histórico.....	35
3.2.3 Resistência bacteriana.....	40
3.2.4 Dificuldades no surgimento de novas opções terapêuticas	46
3.3 Fungos	48
3.4 O Gênero <i>Trichoderma</i>	54
3.4.1 Nomenclatura e a História Taxonômica	54
3.4.2 Características Gerais.....	56
3.4.3 Metabólitos Secundários e a Importância do gênero.....	62
4 METODOLOGIA	68
4.1 Seleção e Reativação de isolados de <i>Trichoderma spp.</i>	68
4.2 Fermentação Submersa	69
4.2.1 Preparação do Inóculo	69
4.2.2 Condições do cultivo em meio líquido	70
4.3 Avaliação da produção de biomassa fúngica (Peso da massa seca)	72
4.4 Avaliação da produção de colorantes	73
4.5 Avaliação da atividade antibacteriana	74
4.5.1 Reativação e manutenção de amostras clínicas bacterianas	74
4.5.2 Screening pelo Método do Bloco de Gelose	74
4.5.3 Teste antibacteriano em microplaca de 96 poços	76
4.5.3.1 <i>Suspensão celular do patógeno</i>	76
4.5.3.2 <i>Preparação das Microplacas e realização do ensaio</i>	77
4.5.4 Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	80
4.5.4.1 <i>Preparação dos filtrados</i>	80
4.5.4.2 <i>Preparação das Microplacas e realização do ensaio</i>	80

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.1 Avaliação da produção de biomassa	84
5.1.1 Influência da temperatura na produção de biomassa de <i>Trichoderma</i> spp.	84
5.1.2 Influência do pH na produção de biomassa de <i>Trichoderma</i> spp.	86
5.1.3 Influência da luminosidade na produção de biomassa de <i>Trichoderma</i> spp.	89
5.2 Avaliação da produção de colorantes	92
5.2.1 Influência da temperatura na produção de colorantes por <i>Trichoderma</i> spp.	92
5.2.3 Influência da luminosidade na produção de colorantes por <i>Trichoderma</i> spp.	96
5.2 Avaliação da atividade antibacteriana	104
5.2.1 Triagem Inicial (Método do Bloco de Gelose).....	104
5.2.2 Teste Antibacteriano em microplaca para análise dos filtrados de <i>Trichoderma</i> <i>virens</i> CFAM 1144	108
5.2.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI)	114
6 CONCLUSÕES	117
7 REFERÊNCIAS	118
APÊNDICE A- RESULTADOS (ABSORBÂNCIAS) ORIUNDOS DA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO, EM UM LEITOR DE MICROPLACA (595NM), PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE FILTRADOS DO <i>Trichoderma</i> <i>virens</i> CFAM 1144 CONTRA 4 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE INTERESSE MÉDICO <i>E. coli</i> <i>CBAM 0001</i>; <i>B.cereus</i> <i>CBAM 0549</i>; <i>P. aeruginosa</i> <i>CBAM 0665</i>; <i>K.penumoniae</i> <i>CBAM</i> <i>0672</i>	130

1 INTRODUÇÃO

A cor é responsável por cerca de 62-90% da avaliação do cliente, quanto a qual produto comprar, por isso é uma característica que movimenta bilhões no mercado de corantes e pigmentos. Além disso, ocorreu uma mudança nas demandas dos consumidores, que passaram a buscar substâncias coloridas, não tóxicas, benéficas ao corpo, entre outras funções, incentivando a indústria a fazer intensas buscas por novas opções (VIERA *et al.*, 2019; YUSUF *et al.*, 2017).

Toda essa valorização acontece porque a cor é um fator que sempre teve um papel significativo na formação de diferentes culturas, em todo o mundo, influencia cada momento da vida, desde as roupas e suas tendências ao mobiliário das casas (VIERA *et al.*, 2019; YUSUF *et al.*, 2017).

Na indústria alimentícia, a cor é um atributo sensorial decisivo no sucesso de um produto. O consumidor a utiliza como um indicador quanto a sua qualidade, se corresponde ao seu imaginário, em características como sabor, segurança, valor nutricional, entre outros (SIGURDSON *et al.*, 2017).

Os compostos químicos que fornecem cor aos produtos são chamados de colorantes, com diferentes classificações, por exemplo, quanto à solubilidade em água, os quais são denominados como corantes quando solúveis e pigmentos quando insolúveis. Também podem ser classificados quanto à fonte de origem, podem ser sintético ou natural, de origem microbiana, animal, mineral e vegetal (NEVES, 2016; OLIVEIRA, C., 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SARON; FELISBERTI, 2006).

Os colorantes naturais são renováveis, biodegradáveis, eco-friendly (Amigos do meio ambiente), usados em tintura têxtil, ingredientes em alimentos, cosméticos e vários produtos farmacêuticos. Aqueles que se originam do Reino Fungi podem ser isolados de uma variedade de espécies, são considerados com grande potencial e com funções biológicas marcantes (ARULDASS *et al.*, 2018; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Esses microrganismos os produzem, durante o seu metabolismo secundários para serem mecanismos de resistência e proteção contra agentes abióticos e bióticos, como radiações ultravioletas, competição pelo habitat, nutrientes, diante de bactérias patogênicas para a sua espécie, entre outras (ARULDASS *et al.*, 2018; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

As pesquisas mostram que muitos desses metabólitos são capazes de tingir tecidos, sejam eles de couro, algodão ou nylon, de forma bem-sucedida. Essa capacidade técnica indica a necessidade de acontecerem estudos, em maior número, que investiguem as opções disponibilizadas pela natureza (ARULDASS *et al.*, 2018; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Historicamente, esses compostos são extraídos da natureza desde a época da pré-história, sendo possível observar nas pinturas rupestres. Porém, com o desenvolvimento do primeiro corante sintético, nomeado de malveína, muitos outros foram produzidos e acabaram por ganhar o mercado, devido a aspectos técnicos, como a estabilidade química e a baixa produção (FERREIRA *et al.*, 2018; GMOSEK *et al.*, 2018; HEER; SHARMA, 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SIGURDSON *et al.*, 2017).

Atualmente, o consumidor clama por uma mudança no mercado devido aos problemas relacionados com essa classe, tanto ao nível ecológico quanto de saúde humana. Há pesquisas que os relacionam à hiperatividade em crianças e alergias diversas em pessoas com essa sensibilidade (FERREIRA *et al.*, 2018; GMOSEK *et al.*, 2018; HEER; SHARMA, 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SIGURDSON *et al.*, 2017).

Devido a essas associações negativas, os colorantes de origem natural passaram a ser novamente desejados e exigidos. Então, para se manterem competitivas, as indústrias passaram a tentar substituir os sintéticos pelos naturais, o que se tornou um grande desafio, já que as opções disponíveis no mercado são limitadas (MEJIA *et al.*, 2020; YUSUF; *et al.*, 2017).

Outro produto fúngico de grande destaque são os antibióticos, sejam eles naturais ou sintéticos, citostáticos ou citotóxicos. Essas substâncias possuem a bactéria como microrganismo alvo e atuam em diversas frentes. Com frequência, interferem na síntese de proteínas, dos ácidos desoxirribonucleicos (DNA), dos ácidos ribonucleicos (RNA), nos metabólitos essenciais e na organização da membrana (GUIMARÃES *et al.*, 2010; ZAMAN *et al.*, 2017).

Durante o século XIX, as infecções foram os principais motivos de mortes entre os seres humanos, porém com o advento da descoberta e da disseminação do uso dos antibióticos, no século XX, inicia-se a “era dos antibióticos ou era dourada”. Essa era foi sinônimo de dois nomes, Alexander Fleming e Paul Ehrlich, e fez surgir a crença

que as doenças transmissíveis estavam quase erradicadas (MUZAMMIL *et al.*, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

Fleming, além de ter se destacado pela descoberta da Penicilina, também foi o primeiro a alertar a sociedade da época quanto à resistência a esse mesmo antibiótico, que as bactérias desenvolveram na época. Esse cenário aconteceu em virtude do mal uso, não só desse composto especificamente, mas de toda a classe, em uma concentração inferior à necessária ou pelo uso por um período muito curto (MUZAMMIL *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

Uma das soluções para a resistência bacteriana é o desenvolvimento de novas drogas, porém esse processo ocorre de forma muito lenta. Em contrapartida, o aparecimento de resistências acontece de forma muito rápida, isso faz as novas opções terem seu uso restrito, o que gera pouco lucro para a indústria farmacêutica (MUZAMMIL *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

No reino Fungi, espécies de vários gêneros possuem antibióticos, colorantes entre outras substâncias como metabólitos para diversas aplicações biotecnológicas. Um desses gêneros é o *Trichoderma* spp., ascomiceto onipresente no meio ambiente, principalmente no solo, de crescimento rápido e produtor de esporos verdes. É extremamente competitivo na colonização de seu habitat, produtor de vários metabólitos secundários, voláteis e não voláteis (ABREU; PFENNING, 2019; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHARMA *et al.*, 2019).

Metabólitos secundários são compostos químicos diversos e relacionados com vias de sinalização, desenvolvimento e interação com os organismos próximos. São importantes, até mesmo fundamentais, na colonização do hábitat desejado, pois fornece ao fungo uma vantagem ecológica. São cruciais no equilíbrio, na regulação e na sobrevivência dos microrganismos (KELLER, 2019; MATUSZEWSKA *et al.*, 2018; NEGREIROS, 2020; PAMPHILE *et al.*, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

No caso dos *Trichoderma*, são várias as classes, atividades e organismos alvos de seus metabólitos secundários como a 6-pentil- α -pirona (6-PP). Esse possui atividade antimicrobiana e realiza induções benéficas às plantas. Já as benzoquinonas, por exemplo a aurantiogliocladina, são voláteis, com efeito antagonista contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse gênero de fungo também é capaz de produzir uma grande variedade de pigmentos, do

amarelo-esverdeado brilhante ao avermelhado (ABREU; PFENNING, 2019; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHARMA *et al.*, 2019).

Diante de todas essas problemáticas, a investigação de novas e eficientes opções de antibióticos e de colorantes naturais é de suma importância para a nossa sociedade atual. Os fungos de origem do solo são microrganismos muito promissores, pois são fornecedores, já conhecidos, de substâncias de mesma atividade biológica e/ou de grande interesse biotecnológico (AGUIAR *et al.*, 2015; ARULDASS *et al.*, 2018; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019; MUZAMMIL *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

É imprescindível que as combinações ideais, entre fatores abióticos e bióticos, sejam encontradas para as cepas a serem usadas pela indústria. Conhecer o comportamento do fungo é o que auxilia a otimizar a obtenção dos metabólitos de interesse (MASCARIN *et al.*, 2019).

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência de alguns fatores físico-químicos na produção de biomassa, colorantes e moléculas com atividade antibacteriana em diferentes cepas de *Trichoderma spp.*

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de fatores físico-químicos no crescimento celular, produção de colorantes e na atividade antibacteriana por *Trichoderma* spp.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da temperatura, do pH e da exposição à luz na produção de biomassa e colorantes em cultivo submerso, por fungos do gênero *Trichoderma* spp.

Avaliar a atividade antibacteriana de isolados de *Trichoderma* spp contra quatro bactérias patogênicas e selecionar os mais promissores.

Avaliar os efeitos da temperatura, do pH e da exposição à luz na produção de antibióticos, em cultivos com meio líquido, pelos fungos selecionados.

Determinar a concentração mínima inibitória dos extratos brutos que apresentaram atividade antibacteriana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

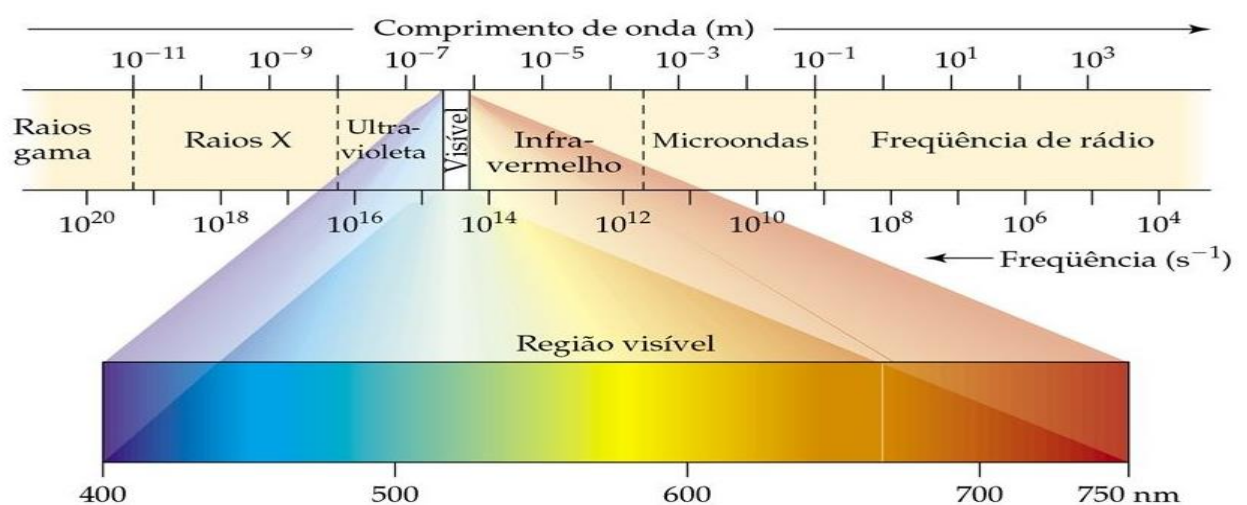
3.1 Colorantes

3.1.1 Cor

A cor é definida como um efeito de aparência ou uma sensação visualizada, em resposta a um estímulo fornecido às células responsáveis pela visão, na forma de luz, e transmitido ao cérebro como sinais elétricos. É caracterizada como subjetiva, pois a cor percebida está intimamente ligada à fonte da luz irradiada, ao objeto que é visualizado e ao observador, classificados como os três elementos essenciais para se realizar a distinção das cores (BROWN *et al.*, 2016; FUCK, 2018; MARTINS *et al.*, 2015; SILVA, 2013).

A luz pode ser definida como um conjunto de ondas eletromagnéticas, que corresponde a uma parte do espectro de radiações eletromagnéticas chamada de visível, com comprimentos de onda em uma faixa em torno de 400 até 750 nm, dividida em intervalos e cada um deles corresponde a uma cor específica que será absorvida, como pode ser visto na Figura 1 (BILAL *et al.*, 2020; BROWN *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2015; OLIVEIRA, C., 2017; SILVA, 2013; SILVEIRA, 2015).

Figura 1- Espectro Eletromagnético com destaque na região visível



Fonte: Brown *et al.* (2005).

Fora desses limites existem outras radiações, como o infravermelho e a ultravioleta, algumas mais energéticas com potencial para causar danos às células,

como as radiações gama e os raios x, outras com baixa energia, como as ondas de Tv e rádio, mas que não formam cores nem imagens por não serem captadas pelo sistema de visão humano (BROWN *et al.*, 2005; FUCK, 2018; MARTINS *et al.*, 2015; SILVA, 2013).

A fonte de luz, como por exemplo o sol, as lâmpadas incandescentes, as fluorescentes e as de sódio, é considerada um elemento determinante, porque sem ela não haveria manifestação de nenhuma cor (SILVA, 2013).

De acordo com a fonte usada, o mesmo objeto pode manifestar diferentes colorações, pois cada uma delas irradia uma luz com uma composição espectral diferenciada, podendo haver interferência também, dos olhos do observador, do seu ângulo de visão e da composição do objeto; por isso, a cor é considerada uma característica mutável (SILVA, 2013).

Então, um composto só pode ser colorido se for capaz de absorver radiações eletromagnéticas da luz visível, mas essa absorção só vai acontecer se o elétron do mesmo necessitar de uma energia correspondente à presente em alguma porção espectral da luz, para o mover do seu estado fundamental em direção ao seu estado excitado. Assim, depende de quais energias são absorvidas e quais seguem para o ambiente para uma determinada cor ser visualizada (BROWN *et al.*, 2016).

Porém, o processo de visualização da cor pode ocorrer através de algumas possibilidades. O objeto pode absorver todos os comprimentos de onda que constituem a luz, menos o intervalo correspondente à cor laranja; é essa parte da luz que chega no olho humano, conseqüentemente é a cor visualizada (BROWN *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2015).

Mas também, pode ser que o objeto absorva apenas a faixa referente a cor azul, permite dessa maneira que todo o resto do espectro visível chegue nas células da visão e mesmo assim, seja observada a cor laranja, devido ao fato de serem cores complementares, possível de se verificar no disco ou roda de cores (FIGURA 2) (BROWN *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2015).

No entanto, nos casos extremos, se o objeto for capaz de absorver todos os comprimentos de onda da faixa visível, nenhum será refletido e captados pelos olhos, então ele se apresentará da cor preta, ou seja, o preto é, na verdade, a ausência das cores. Mas caso ele venha a refletir todos os comprimentos da luz visível, ou seja, não absorver nenhum, vai se apresentar na cor branca, logo, o branco é a mistura de todas as cores (BROWN *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2015; SILVA, 2013).

Figura 2-Possibilidades da percepção da cor e o Disco ou Roda de Cores



Fonte: Brown *et al.*(2016).

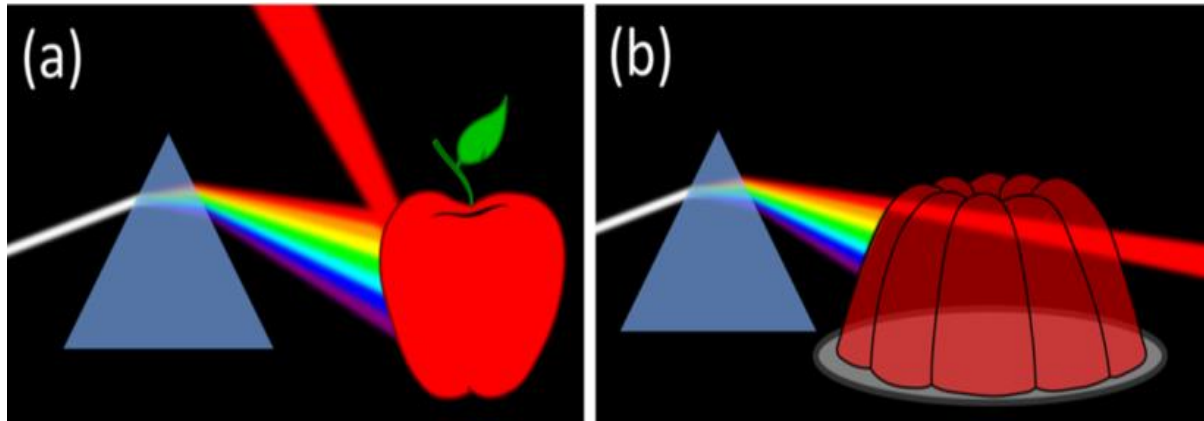
Objetos são opacos porque cada vez que a luz incide sobre eles, ela não é transmitida para o outro lado, tanto que não é possível visualizar nada através dele e sim refletida. Porém, podem ser opacos e coloridos ao possuírem componentes que refletem a cor de forma seletiva, como por exemplo a maçã, que absorve todas as outras cores e reflete os comprimentos de onda correspondentes ao vermelho. No entanto, se for opaco e branco, vai refletir todas as cores, agora se for preto, não refletirá nenhuma cor porque absorve todas (HENRIQUE *et al.*, 2019).

Caso o objeto seja transparente, significa que ele é capaz de realizar a transmissão da luz, ou seja, ele permite que ela passe, se propague, sem obstruir ou desviar muito esse caminho; não ocorre atenuação nem a distorção da imagem que está atrás do objeto, o que possibilita enxergar de forma clara através dele. Se essa transmissão apresenta um desvio da trajetória da luz, devido à diferença da velocidade de propagação da luz no ar e ao atravessar o objeto, um fenômeno chamado de refração, ele vai se apresentar incolor (BROWN *et al.*, 2016; HENRIQUE *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2015).

Mas se ele transmite a luz de forma seletiva, isto é, transparente, mas vermelho, isso quer dizer que apenas os intervalos do espectro referentes a essa cor passam através da amostra e o resto é absorvido por ela. Os meios translúcidos também aparecem coloridos da mesma forma que o transparente, mas a transmissão da luz acontece de forma irregular, difusa, o que impede a visualização total do que estiver atrás, considerado distorcido ou embaçado. Logo, é possível perceber que os objetos

podem possuir a mesma cor, mas não necessariamente pelos mesmos mecanismos físicos (FIGURA 3) (HENRIQUE *et al.*, 2019).

Figura 3-Processo da formação da mesma cor em objetos opacos e transparentes



Fonte: Henrique *et al.* (2019).

Nota: Objetos opacos (a) formam a cor, nesse caso o vermelho, por reflexão seletiva de luz e os objetos transparentes (b) apresentam a cor por transmissão seletiva.

Espectrofotômetros e colorímetros são equipamentos que possibilitam a caracterização das cores. O primeiro fornece uma análise mais completa, em virtude da realização de uma maior separação da luz em subdivisões, permitindo que cada comprimento de onda irradie na amostra, contido no interior da cubeta, e ser analisado o nível de absorbância da amostra, ou seja, quais e quanto desses comprimentos chegam no detector (SILVA, 2013; TORRES, 2018).

É de grande importância, principalmente, na comparação entre cores, pois possui uma capacidade superior de diferenciação em comparação ao olho humano, por conseguir verificar diferenciações mínimas nas absorbâncias de cores, ao informar que estão em concentrações diferentes, o que para as células da visão vai passar despercebido (SILVA, 2013; TORRES, 2018).

As cores influenciam em todos os ramos da vida humana, como nas roupas, nos móveis, nos cosméticos e, principalmente, nos alimentos, o que torna tudo mais fascinante e atraente. É um dos elementos básicos da natureza, encontra-se presente em tudo, inclusive, há quem afirme que a vida no planeta Terra depende das substâncias que fornecem cor, isso em virtude de exemplos como a clorofila, na qual sem ela as plantas não conseguem produzir seu próprio alimento, e a hemoglobina,

que sem a sua atuação o oxigênio não poderia ser transportado dentro dos seres vivos (TORRES, 2018; RAO *et al.*, 2017).

É uma característica tão poderosa, carrega tanta informação, que se tornou uma grande ferramenta de marketing. As identidades visuais tornam-se muito mais eficientes na relação do cliente com a marca, podem moldar as percepções e atraí-los, o que gera um forte relacionamento do público-alvo com a marca. Dois grandes exemplos são a Coca-Cola e a Pepsi, na qual o vermelho já está fortemente associado ao primeiro e o azul ao segundo (COSTA, 2017).

No caso dos alimentos, a coloração dos mesmos não é só uma das primeiras características que atraem para a sua escolha e aquisição, principalmente por crianças, como também influencia na percepção de outros atributos sensoriais. É possível manipular a cor desejada, restituí-la em alimentos que já a perderam e torná-los mais desejáveis (OLIVEIRA, C., 2017; SILVA, 2013).

3.1.2 Corantes x Pigmentos

Os produtos podem ter a sua cor modificada através da adição de diversas substâncias chamadas de colorantes. São definidos como substâncias naturais ou artificiais/sintéticas, usadas com a finalidade de fornecer uma cor durável, além de restaurar ou até mesmo realçar a sua aparência (NEVES, 2016; OLIVEIRA, C., 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SARON; FELISBERTI, 2006; SILVA, 2013).

Assim, possuem enorme importância para as indústrias, principalmente cosmética, alimentícia e têxtil, que possuem na cor um grande fator de impacto nos seus negócios. São classificados em pigmentos e corantes, apesar de muitos autores utilizarem esses termos como sinônimos, na verdade eles são distintos, principalmente, em relação a tamanho das partículas e quanto a solubilidade no meio em que estão presentes (NEVES, 2016; OLIVEIRA, C., 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SARON; FELISBERTI, 2006; SILVA, 2013).

Os pigmentos são as substâncias que possuem, de uma forma geral, partículas maiores, sólidas, quase insolúveis e não afetados física e quimicamente, ao serem incorporados em seus solventes ou veículos, sejam eles de origem orgânica ou inorgânica. Suas partículas podem se apresentar coloridas, pretas, brancas ou fluorescentes, podem agregar ao material, de forma simultânea, cobertura, opacidade,

tingimento e uma nova cor (NEVES, 2016; OLIVEIRA, C., 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SARON; FELISBERTI, 2006; SILVA, 2013; ZENEBON *et al.*, 2004).

Já os corantes são substâncias que possuem partículas menores, solúveis no meio em que está imerso, podendo ser coloridos ou fluorescentes. Também possuem como característica, trazer ao produto cor e tingimento, mas não cobertura e opacidade; por isso eles têm a capacidade de manter a transparência do objeto que foi pintado, podem ser visualizados os detalhes, mesmo depois do processo do tingimento (NEVES, 2016; OLIVEIRA, C., 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SARON; FELISBERTI, 2006; SILVA, 2013; ZENEBON *et al.*, 2004).

Essa solubilidade está diretamente relacionada com a presença de certos grupos químicos na estrutura desses compostos, o que faz, em algumas situações, com que alguns colorantes possam ser considerados, com relação a esse quesito, ora como corantes, ora como pigmentos, de acordo com a interação existente entre as moléculas desse colorante e do material onde ele foi adicionado (SARON; FELISBERTI, 2006).

Outra classificação é, justamente, quanto à sua estrutura química, que pode ser um composto orgânico ou inorgânico. No caso dos orgânicos, para apresentar alguma cor é necessário que ocorram ressonâncias eletrônicas nessa estrutura, há a capacidade absorção das radiações magnéticas do espectro visível. Ao ser realizada a aplicação desses colorantes em polímeros, devem ter estabilidade térmica, química e mecânica. Dentre os grupos existentes, dois se destacam, os do tipo Azo e os Policíclicos (SARON; FELISBERTI, 2006).

Os inorgânicos são mais utilizados por possuírem alta estabilidade química, alto poder de tingimento e, ao serem aplicados em polímeros, pouco afetam as características reológicas deles, mas sempre são usados de forma combinada com os orgânicos, em virtude da pouca variação de cor dessa categoria (SARON; FELISBERTI, 2006).

3.1.3 Naturais x Sintéticos

Há milhares de anos, as cores causam fascínio na humanidade. O uso de colorantes naturais não tem uma data de início exata, não se sabe com precisão como se deu a sua descoberta; no entanto, muito provavelmente, ocorreu devido às suas propriedades medicinais e foi incorporado aos costumes das sociedades antigas por

questões religiosas (FERREIRA *et al.*, 2018; GMOSEK *et al.*, 2017; HEER; SHARMA, 2017; KISCHKEL *et al.*, 2018; LIMA, 2018; LUCARINI *et al.*, 2017; MALDONADO; IBARRA, 2006; OLIVEIRA, L., 2017; RAO *et al.*, 2017; SARVAMANGALA; APARNA, 2016; YUSUF *et al.*, 2017).

Na pré-história, eram utilizados na pintura rupestre, possuindo uma durabilidade tão grande que resistiram ao tempo e até hoje estão presentes em muitas cavernas. A Bíblia menciona o açafrão para fins de coloração e a hena é usada desde antes de 2.500 A.C. O primeiro corante natural descoberto foi o Carbon Black, mas por volta do ano 3.000 A.C. (FERREIRA *et al.*, 2018; HEER; SHARMA, 2017; MALDONADO; IBARRA, 2006; RAO *et al.*, 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013).

No período Glacial, foram feitas pinturas nas paredes das cavernas pelos caçadores, com ocre e fuligem, como parte do seu culto religioso. Os romanos, ocupantes do cargo de centurião, pintavam suas capas com um corante vermelho, oriundo do molusco marinho *Murex sp* e também realizavam a coloração do vinho (HEER; SHARMA, 2017; RAO *et al.*, 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013).

Na Europa, há evidências do tingimento já ser um processo presente na Idade do Bronze. Com o decorrer do tempo, na Antiguidade, eram também usados na China. Da mesma forma que na Índia, foram encontradas roupas coloridas em ruínas, referentes à Civilização do Vale do Indo (2.500 A.C) e também à Civilização Mohenjo-Daro e Harappa (3.500 D.C) (FERREIRA *et al.*, 2018; HEER; SHARMA, 2017; MALDONADO; IBARRA, 2006; RAO *et al.*, 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SIGURDSON *et al.*, 2017) .

No Egito, fazia parte dos seus costumes envolver corpos mumificados com tecidos coloridos, tanto que um pigmento chamado Alizarina, foi encontrado no túmulo do Rei Tutancâmon(HEER; SHARMA, 2017; RAO *et al.* 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SIGURDSON *et al.*, 2017; YUSUF *et al.*, 2017).

Alguns documentos descreviam a coloração de drogas, com a própria escrita feita com esses colorantes, além de realizarem a síntese do corante inorgânico Azul Egípcio e foram os primeiros a adicionarem extratos naturais coloridos nos doces da época e no Japão, no Período Nara (Século VIII), que coloria os bolos de soja e os feijões Azukis (HEER; SHARMA, 2017; RAO *et al.* 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SIGURDSON *et al.*, 2017; YUSUF *et al.*, 2017).

Até 2016, acreditava-se que o uso mais antigo do corante Índigo, um dos mais valorizados na época e ainda globalmente difundido, principalmente, no tingimento do

jeans, havia sido na Quinta Dinastia do Egito, há 4.400 anos atrás, obtido a partir da planta *Isatis tinctoria* (SANTOS-EBINUMA, 2013; SPLITSTOSER *et al.*, 2016).

Porém, Splitstoser *et al.* (2016) descobriram que 1.500 anos antes, na costa norte do Peru, tecidos de algodão com traços de um pigmento azul, identificado como indigoide (indigotina), extraído provavelmente da *Indigofera* spp., nativa da região da América do Sul.

Na América há registros do uso do Corante Cochonilha em materiais da Cultura Asteca e Maia, mas as civilizações indígenas como um todo desse continente utilizavam esses colorantes naturais nas pinturas dos corpos e dos cabelos, para fins estéticos, religiosos, de proteção e de comunicação (FERREIRA *et al.*, 2018; HEER; SHARMA, 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013).

Na Idade Moderna, com o descobrimento do Brasil, os europeus começaram a extrair um corante avermelhado, oriundo de árvores conhecidas como Pau-Brasil, com o intuito de realizar o tingimento de tecidos. Em 1856 houve a elaboração do primeiro corante orgânico sintético, chamado de Malveína ou Malva, de coloração roxa, também chamado de roxa anilina, pelo químico inglês William Henry Perkin (FERREIRA *et al.*, 2018; GMOSER *et al.*, 2018; HEER; SHARMA, 2017; SANTOS-EBINUMA, 2013; SIGURDSON *et al.*, 2017).

Desde então, iniciou-se uma revolução no mundo dos colorantes; os naturais foram progressivamente substituídos pelos sintéticos, principalmente nas indústrias, sejam elas têxteis, de alimentos, de cosméticos, entre outras, o que marcou o início de uma era industrial e comercial mais moderna (GMOSER *et al.*, 2018; OLIVEIRA, L., 2017).

Porém, essa mudança radical só aconteceu devido a algumas desvantagens comerciais e tecnológicas, que os colorantes naturais apresentavam, assim como outras tantas vantagens dos sintéticos. É necessário ressaltar que, por serem recentes na época, ainda não eram bem esclarecidas as suas desvantagens, principalmente para a saúde humana, para uma melhor avaliação (GMOSER *et al.*, 2018; OLIVEIRA, L., 2017).

Os colorantes obtidos por rotas sintéticas tornaram-se populares no meio industrial por diversos motivos, como o baixo custo da produção, alta resistência tintorial, maior estabilidade química a luz, ao oxigênio e aos pHs, produção em larga escala mais fácil, propriedades de coloração superiores, já que com uma pequena quantidade é possível colorir qualquer coisa, com uniformidade nessa cor e baixa

contaminação microbiológica (GMOSER *et al.*, 2018; RAO *et al.*, 2017; SIGURDSON *et al.*, 2017).

No século XX, cerca de 700 dessas substâncias foram oferecidas, contudo, os inúmeros problemas relacionados ao seu uso contínuo começaram a aparecer, como resultado o mercado consumidor passou a exigir a mudança desse cenário. As legislações passaram a ficar mais rígidas, levou a limitação dessa lista, por exemplo, no Brasil cerca de 11 corantes com uso permitido (KISCHKEL *et al.*, 2018; OLIVEIRA, L., 2017).

No entanto, o uso contínuo desses colorantes sintéticos se mostrou prejudicial tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana, considerada controversa a presença deles ainda nas composições apenas pelo viés da estética. Algumas indústrias justificam o uso por questões tecnológicas e comerciais, mas não tão desejada pelos consumidores, cada vez mais informados e preocupados, por isso a incessante busca por alternativas (ARAÚJO *et al.*, 2019; HEER; SHARMA, 2017; KISCHKEL *et al.*, 2018; LIMA, 2018; OLIVEIRA, C., 2017; OLIVEIRA, L., 2017) .

O problema para o meio ambiente é o fato de não serem biodegradáveis, em virtude da origem da maioria ser no refinamento do petróleo e ao serem descartados nos rios e afluentes, interferirem na fotossíntese de forma direta, ao mudar a coloração da água, o que culmina em prejuízo na cadeia alimentar por anos (ARAÚJO, *et al.*, 2019; GMOSER *et al.*, 2018; KISCHKEL *et al.*, 2018; LIMA, 2018; OLIVEIRA, C., 2017; OLIVEIRA, L., 2017; RAO *et al.*, 2017). Contribuem para o esgoto da indústria têxtil ser classificado como o mais poluente entre os dos setores industriais, em termos de volume e composição, porque na maior parte das vezes pertencem ao grupo azoico e colorem de forma ineficiente.

Apesar das inúmeras propostas de tratamento desses efluentes, como precipitação, floculação, adsorção, coagulação e oxidação, nenhum deles realmente foi bem aceito por serem caros, por possuírem eficiência limitada e por gerarem resíduos que também precisam de tratamento (ARAÚJO *et al.*, 2019; PEIXOTO *et al.*, 2013; SANTOS, 2018).

No caso dos humanos, são inúmeros os problemas associados, já evidenciados em laboratórios, como os efeitos mutagênicos, teratogênicos, cancerígenos e alergênicos. São também frequentemente associados a crises de asma e ao aumento da hiperatividade em crianças, o que fez muitos países limitarem o seu uso através de legislações mais rígidas. Mas, ainda há divergências nesse aspecto, pois alguns

limitam o uso em qualquer concentração e outros apenas a concentração (COSTA, 2017; LIMA, 2018; OLIVEIRA, L., 2017; PRADO; GODOY, 2003; RAO *et al.*, 2017; SANTOS, 2018; SIGURDSON *et al.*, 2017; VIERA *et al.*, 2019).

Alguns exemplos são os casos das tinturas de cabelo, já bem relacionadas ao aparecimento de leucemias em crianças com menos de 2 anos, se usadas por mulheres grávidas. Alguns estudos mostraram a genotoxicidade da quinolina amarela, pois interfere na estabilidade do DNA *in vitro*, o que gera quebras e perdas cromossômicas (KISCHKEL *et al.*, 2018; LIMA, 2018; OLIVEIRA, C., 2017).

Outros alertam sobre o perigo de alguns corantes alimentares como o amarantho, a eritrocina e a tartrazina, por possuírem forte probabilidade de serem tóxicos aos linfócitos humanos, ao ocorrer a ligação direta com o DNA, entre outras situações relacionadas ao seu uso contínuo (KISCHKEL *et al.*, 2018; LIMA, 2018; OLIVEIRA, C., 2017).

Os biocolorantes ou colorantes naturais podem ser classificados segundo a sua fonte, como as plantas (podendo ser das flores, das folhas e dos frutos), os animais (Insetos), os microrganismos (Fungos, bactérias, leveduras e microalgas) e os minerais (CRIZEL, 2017; KISCHKEL *et al.*, 2018; LIMA, 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016; SILVA, JÚNIOR *et al.*, 2018).

Também, segundo a sua estrutura química, por exemplo, os derivados de flavonoides, como as Antocianinas, de isoprenoides, como os Carotenoides, de pirrol, como a Clorofilas e os heterocíclicos de Nitrogênio, como as Betalaínas e segundo a cor visualizada (CRIZEL, 2017; KISCHKEL *et al.*, 2018; LIMA, 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016; SILVA, JÚNIOR *et al.*, 2018).

Apesar dos colorantes naturais, normalmente, não serem muito estáveis nem tão brilhantes, uma vez que muitos sofrem mudanças na cor ao serem expostos a variações de pH, principalmente em valores neutros e mais básicos, a variações de temperatura, ou até mesmo na presença da luz (HEER; SHARMA, 2017; LUCARINI *et al.*, 2017; OLIVEIRA, L., 2017; RAO *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2012).

Além de apresentarem baixa solubilidade em água e não estarem disponíveis o ano inteiro, mas de acordo com a sua fonte, eles são classificados como atóxicos, biodegradáveis, não só menos danosos à saúde humana, como também benéficos, por exemplo, antioxidante (HEER; SHARMA, 2017; LUCARINI *et al.*, 2017; OLIVEIRA, L., 2017; RAO *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2012).

Esses benefícios podem ser funcionais e até nutricionais, não só para os humanos, mas também para os animais. Inclusive já são usados alguns colorantes naturais na alimentação animal, com o intuito não só de melhorar a aparência como também o perfil nutricional. A dieta utilizada no crescimento deles afeta diretamente algumas características importantes, como a cor da pele das aves, tonalidade das gemas dos ovos e a carne do salmão (GMOSER *et al.*, 2018).

Para os humanos, os colorantes naturais podem ter inúmeros benefícios, como atividade antioxidante, antitumoral e antimicrobiana. Alguns exemplos são os carotenoides, que além dessas atividades, atuam também como pró-vitamina A (COSTA, 2017; GMOSER *et al.*, 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

Os flavonoides, antioxidantes que influenciam na saúde cardiovascular, na prevenção de câncer, diminuição da necessidade insulina, em diabéticos tipo 2, e na melhora da cognição das mulheres em tempos de menopausa. Também a curcumina, que além de corante, condimento e possuidor das atividades citadas acima, são antiaflatoxigênicas com relação as toxinas do *Aspergillus flavus* (COSTA, 2017; GMOSER *et al.*, 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

Dentre as possíveis fontes dessas substâncias, as de origem vegetal e microbiana se destacam. As de origem vegetal apresentam diversas limitações, algumas são comuns aos colorantes naturais, como a falta de estabilidade na luz, no calor, em pH adverso e a baixa solubilidade em água. Outras são próprias a esse tipo de fonte, pois as plantas sofrem irregularidade de suas colheitas (depende da sazonalidade) e baixa produção em larga escala. Além disso, exigem muito cuidado e regulamentação do uso da terra, não conseguindo suprir as necessidades industriais (GMOSER *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2015; OLIVEIRA, C., 2017; SANTOS, 2018).

Aqueles que são de origem microbiana aparecem como uma alternativa para a produção desses colorantes em concentrações mais altas, com grande potencial para as cores amarelo a vermelho e têm os fungos filamentosos como os produtores mais eficientes (KISCHKEL *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2015; OLIVEIRA, C., 2017; VELMURUGAN *et al.*, 2009).

São inúmeras as vantagens, como o fato de ser uma fonte renovável, biodegradável, com baixo impacto ambiental, com microrganismos que crescem rápido e independente das condições climáticas, toleram diferentes pHs e temperaturas, principalmente, pelo fato de existirem técnicas apropriadas de seleção, mutação ou engenharia genética, para auxiliar no aumento significativo da produção

em comparação aos microrganismos selvagens (KISCHKEL *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2015; OLIVEIRA, C., 2017; VELMURUGAN *et al.*, 2009).

Outra vantagem é o microrganismo que consegue crescer tanto em cultura submersa quanto sólida, por vezes produzindo o colorante em ambas as situações. Porém, os que são produzidos em fermentação por cultura submersa são ótimas opções por possuírem menor custo e uma extração mais fácil, mas em nenhum há tanto risco de escassez de matéria prima e não há variações sazonais (KUMAR *et al.*, 2015; OLIVEIRA, C., 2017).

Fatores externos afetam a produção por esses seres, como a composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e minerais), a escassez de nutrientes e o excesso da melhor fonte de carbono para o microrganismo como fatores estimulantes, o pH do meio, a temperatura de incubação, o tipo de fermentação, o nível de umidade e a taxa de aeração (KISCHKEL *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2015; SOARES; PIMENTA, 2015).

Alguns fungos de grande impacto econômico nesse campo são *Monascus purpureus*, *Blakeslea trispora*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* e existem outros tantos com potencial e que precisam ser estudados. Seus metabólitos secundários coloridos, por vezes, são termoestáveis, possuem atividades antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, imunossupressor, fitotóxicas, tratam diabetes mellitus, entre outros benefícios (COSTA, 2017; KUMAR *et al.*, 2015; OLIVEIRA, C., 2017).

As antraquinonas são, há muitos anos, compostos com uma significativa contribuição na indústria de corantes e vários fungos, como os *Trichodermas spp.*, são utilizados como fonte de isolamento através das técnicas da biotecnologia (COSTA, 2017; KUMAR *et al.*, 2019; VELMURUGAN *et al.*, 2009).

Outros compostos que se destacam como colorantes fúngicos são os ácidos carboxílicos de antraquinona, as pré-antraquinonas, as melaninas, as flavinas, carotenoides, as quinonas, os licopenos, as fenazinas, violaceínas, índigo e as monascinas. A atuação na prática de muitos desses já são demonstradas em muitos estudos, como o tingimento de algodão, seda, lã e couro (COSTA, 2017; KUMAR *et al.*, 2019; VELMURUGAN *et al.*, 2009).

Na área de alimentos, passaram a autorizar o uso desses derivados e as pesquisas biotecnológicas alavacaram. Ao passar do tempo, o conhecimento fornecido pela ciência passou a conscientizar a população sobre os inúmeros benefícios relacionados a saúde humana e a sustentabilidade (CRIZEL, 2017; HEER;

SHARMA, 2017; LUCARINI *et al.*, 2017; OLIVEIRA, C., 2017; OLIVEIRA, L., 2017; RAO *et al.*, 2017).

Isso fez o interesse dos consumidores retornar e a necessidade de novas opções, fontes e tecnologias de produção se expandir. O foco foi direcionado a três principais áreas, que são as tecnologias de formulação, de processamento e fontes alternativas de colorantes, o que permite o aumento da utilização dos mesmos na indústria (CRIZEL, 2017; HEER; SHARMA, 2017; LUCARINI *et al.*, 2017; OLIVEIRA, C., 2017; OLIVEIRA, L., 2017; RAO *et al.*, 2017).

3.2 Antibióticos

3.2.1 Características Gerais

Os antimicrobianos são compostos químicos capazes de atuar sobre os microrganismos, podem ser usados para fins preventivos e/ou terapêuticos em humanos e em animais. Dentro dessa classe de medicamentos, estão os que possuem ação direcionada às bactérias chamados de antibióticos, nome que tem origem na palavra grega antibiose (Anti=contra e Bios=vida) e que foi transformada pelo Paul Vuillemin, aluno de Louis Pasteur, em 1889 (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; DEZFULLY; HEIDARI, 2016; FURTADO *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2010; PEREIRA; OLIVEIRA, 2016; SALDANHA *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017).

Só podem ser consideradas para tal atividade, as moléculas que possuem um alvo (ligante) na célula bacteriana e que afetam parte da estrutura ou função desse tipo de célula. Além disso, a concentração utilizada precisa chegar até o alvo em quantidade suficiente para realizar sua ação, mas sem toxicidade para o hospedeiro, (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FURTADO *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2010; PEREIRA; OLIVEIRA, 2016; SALDANHA *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017).

Os antibióticos podem ser classificados de diversas formas, por exemplo segundo sua origem, podendo ser natural, semissintética ou sintética. A primeira opção refere-se aos obtidos a partir de seres vivos, a segunda refere-se às moléculas que são produzidas de forma dividida, ocorre uma modificação molecular, na qual uma parte dela é de origem natural, produzida pelo fungo, por exemplo, mas uma outra parte é adicionada sinteticamente no laboratório. Já a terceira refere-se às moléculas que são produzidas em laboratório (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; GUIMARÃES *et*

al., 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; PEREIRA; OLIVEIRA, 2016; SALDANHA *et al.*, 2018).

A segunda e a terceira acontecem com o objetivo de melhorar características da molécula, como o seu espectro de ação e sua toxicidade. Alguns exemplos de antibióticos naturais e semissintéticos são os β -lactâmicos (Ex: Cefalosporinas, Penicilinas, Monobactamas e Oxapeninas), os aminoglicosídeos (Ex: Estreptomicina), as tetraciclina (Ex: Clortetraciclina) e os macrolídeos (Ex: Eritromicina). Assim como, os peptídeos cíclicos (Ex: Vancomicina, Glicopeptídeos, Lipodepsipeptídeos), as estreptograminas, entre outros (Cloranfenicol, Rifamicinas etc) (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2010; TORTORA *et al.*, 2017).

Alguns exemplos de antibióticos de origem sintética são as sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas. Também podem ser classificados segundo sua ação sobre as bactérias, no caso bactericidas (citotóxicos), ao provocar a morte da célula bacteriana, ou bacteriostático (citostático), ao somente inibir ou atrasar o crescimento desses microrganismos. A segunda opção possibilita que o sistema imunológico os elimine com mais facilidade, há a contraindicação desse segundo para enfermos imunocomprometidos (FERNANDES, 2017; FURTADO *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2010; PEREIRA; OLIVEIRA, 2016; SALDANHA *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017; ZAGUI, 2019; ZAMAN *et al.*, 2017).

O espectro de ação é outra forma de separar esses medicamentos em grupos. Podem ser de amplo ou largo espectro, que são aqueles capazes de ter ação contra uma grande variedade de bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas. Um exemplo desse grupo é a tetraciclina, amplamente usada no combate a bacilos gram-negativos, com também a clamídias, micoplasmas e riquetsias (BRIGANTINI *et al.*, 2016; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017; ZAGUI, 2019).

Além dos antibióticos de largo espectro, existem os de espectro estreito ou restrito, na qual são eficazes apenas contra um grupo seletivo de bactérias, gram-positivas ou gram-negativas, ou com ação limitada contra uma dessas classes. Então, possuem uma aplicabilidade limitada, por exemplo a Vancomicina, que é usada para combater espécies de *Staphylococcus* e *Enterococcus*, e a Penicilina G (BRIGANTINI; *et al.*, 2016; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017; ZAGUI, 2019).

Existem os intermediários, como o próprio nome diz é algo meio termo, nem atua contra uma grande variedade, nem é tão específico. Dessa forma, na clínica, aqueles de espectro de ação restrito é escolhido antes dos outros, justamente para

tentar interferir o mínimo possível nos microrganismos benéficos da microbiota do paciente, conseqüentemente desregulações do organismo, e para evitar o surgimento de resistências (BRIGANTINI *et al.*, 2016; FERNANDES, 2017).

Os antibióticos também podem ser classificados segundo o seu mecanismo de ação ou farmacodinâmico em 5 grupos, denominados e descritos da seguinte forma:

1) Inibidores da síntese da parede celular bacteriana: As células humanas não possuem parede celular logo, não são afetadas por esses agentes. Eles atuam de forma seletiva nas bactérias, atingem as redes de peptidoglicanos, que estruturam essa área ao conferir rigidez, determinar a forma e evitar a ocorrência da lise osmótica. Assim, os antibióticos impedem a formação dessa parede, ao inibir a síntese de peptidoglicanos de diversas formas, de acordo com a substância a ser utilizada (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

De uma forma geral, podem inibir as enzimas que são necessárias ao processo de formação, bloquear a passagem de pirofosfato-bactoprenol à fosfobactoprenol, um precursor da síntese da parede e importante nos processos anabólicos nas bactérias gram-positivas, através da função de carreador de membrana (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Enquanto que, outros conseguem se ligar ao peptídeo D-Ala-D-Ala, através de sua região terminal, o que impede de ocorrerem as ligações cruzadas entre a N-acetilglucosamina e o Ácido N-acetilmurâmico e, por conseguinte, a formação do peptidoglicano para a célula enfraquecer, sofrer lise e morrer (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

2) Desorganizadores de Membrana Plasmática: Essa parte da estrutura da bactéria tem grande importância na sua sobrevivência, pois funciona como uma barreira seletiva, controla o que sai e o que entra, mantém a constituição do interior da célula equilibrada. Conforme o antibiótico escolhido, alguns interagem com constituintes da membrana, como os polissacarídeos, acabam por afetar a sua permeabilidade e fazer com que íons e macromoléculas entrem e saiam de forma desordenada, com sucessiva lise e a morte (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Os agentes que possuem esse mecanismo de ação precisam ser cuidadosamente estudados, antes de chegarem ao mercado, para evitar que realizem interação com as células humanas. Por elas também possuírem membranas celulares, há a necessidade de serem agentes que reconheçam as especificidades

das membranas bacterianas (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

3) Inibição da Síntese Proteica: Alguns processos biossintéticos podem ser inibidos pelos antibióticos, como a síntese de proteínas, considerada uma das funções mais importantes e vitais, dessa forma, considerada um alvo importante nas pesquisas de desenvolvimento de novas moléculas(COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Contudo, é necessária atenção para a possibilidade ou não de ter uma toxicidade seletiva total ou ao menos parcial, a princípio aparentemente improvável porque essa síntese é comum a todas as células, tanto eucariotas quanto procariotas, mas uma grande diferença, entre as estruturas dos ribossomos, permite uma maior especificidade com as de origem bacteriana (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

As células eucariotas possuem ribossomos 80S, com a subunidade maior 60S e a menor 40S. Enquanto os procariotos são constituídos de ribossomos 70S, com a subunidade maior 50S e a menor 30S, o que permite a toxicidade seletiva, através da ligação dos compostos a uma das subunidades dos ribossomos procarióticos, o que provoca alguma interferência em uma das 3 fases da tradução do mRNA. Mas por vezes essa toxicidade é parcial, produzindo efeitos adversos no paciente, devido ao fato das mitocôndrias, organelas eucarióticas, trazerem ribossomos 70S no seu interior semelhantes às das bactérias (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

4) Inibição da Síntese de Ácidos Nucleicos: Esses fármacos são de produção e utilidade extremamente limitada, já que por vezes interferem no metabolismo dos ácidos nucleicos do enfermo também. Agem interferindo na transcrição e/ou replicação desses ácidos, processos presentes em todo tipo de célula (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Assim, o que permite uma maior especificidade são os alvos, no caso as enzimas envolvidas nos processos, pois elas possuem diferenças significativas entre os eucariotos e procariotos, dessa forma, comprometem a multiplicação e a sobrevivência celular (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

5) Inibição da Síntese de Metabólitos Essenciais: Esses compostos químicos, com atividade antibiótica, podem agir como antimetabólitos, ou seja, podem inibir

atividades enzimáticas, envolvidas no metabolismo bacteriano, de forma competitiva, em virtude da sua estrutura conter grande semelhanças com o substrato normal da enzima alvo (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Guimarães, Momesso e Pupo (2010) produziram a tabela abaixo (Tabela 1), na qual associaram as principais classes de antibióticos a seus alvos e a seus mecanismos de ação, com o intuito de facilitar a compreensão.

Tabela 1-Principais mecanismos de ação antibiótica

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação
β-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapeninas, Monobactamas)	Enzima transpeptidase	Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
β-lactâmicos (Oxapeninas, Sulfoxapeninas)	Enzima β-lactamase	Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β-lactâmicos.
Macrolídeos, Lincosamidas, Estreptograminas (Dalfopristina e Quinupristina), Cloranfenicol, Oxazolidinonas (Linezolida)	Subunidade 50S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Aminoglicosídeos, Tetraciclina	Subunidade 30S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Glicopeptídeos (Vancomicina, Teicoplanina)	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano	Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
Peptídeos não ribossomais (Bacitracina, Gramicidina C, Polimixina B)	Membrana plasmática	Afetam permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana.
Lipopeptídeos (Daptomicina)	Membrana plasmática	Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram positivo.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA.
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase	Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di- hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos.

Fonte: Guimarães, Momesso e Pupo (2010).

Uma forma muito usada é a inibição da síntese do Ácido paraminobenzoico-PABA, por ele ser um precursor da síntese do Ácido fólico, vitamina de grande valor porque atua como coenzima na síntese das bases nitrogenadas e de vários aminoácidos, podendo haver uma inibição competitiva através de várias enzimas envolvidas, como a dihidropteroato sintetase e a diidrofolato redutase (FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

A seletividade nesse caso acontece pelo fato das células bacterianas precisarem sintetizar Ácido Fólico porque elas não possuem estruturas que possibilitem a absorção oriunda da dieta, como acontece com as células animais (FERNANDES, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

O antibiótico ideal seria aquele que atua de forma seletiva no microrganismo alvo, a bactéria causadora da infecção a ser vencida, com ação bactericida a ser realizada no menor tempo possível. Também precisaria ter um espectro de ação restrito, a fim de não afetar a microbiota própria benéfica do hospedeiro (COSTA E SILVA JUNIOR, 2017; FABIAN *et al.*, 2018; FERNANDES, 2017).

Além disso, seria importante ter o mínimo de toxicidade e reações adversas, várias possibilidades de via de administração, uma boa distribuição e um bom custo-benefício (COSTA E SILVA JUNIOR, 2017; FABIAN *et al.*, 2018).

3.2.2 Histórico

As bactérias são organismos unicelulares descobertas por Van Leeuwenhoek, na década de 1670, em virtude da invenção do microscópio. Apesar da falta de conhecimento do mundo microscópico, os antibióticos já eram usados pelos antigos chineses, há cerca de 2.500 anos. Nessa época, eles já haviam descoberto que a soja mofada conseguia curar furúnculos, carbúnculos e outras infecções.

Os egípcios e gregos antigos utilizavam os bolores e as plantas, mesmo sem saber exatamente o que produzia os efeitos antimicrobianos (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018).

Traços do antibiótico Tetraciclina foram encontrados em restos de esqueletos humanos, identificados como o povo que vivia na Nubia sudanesa, nos anos de 350-550 D.C. Foi possível encontrar esses traços também no eixo médio femoral de pessoas que viveram no período romano do Dakleh Oasis, no Egito (AMINOV, 2010).

Não é comum encontrar esses traços, mas a Tetraciclina é capaz de ser incorporada à parte mineral dos ossos e de fornecer marcadores permanentes. Isso permitiu a conclusão, sobre a possível circulação de genes de resistência, antes mesmo da inserção de alguns antibióticos no mercado pelas indústrias farmacêuticas. Outra possibilidade de exposição prévia, é na medicina tradicional chinesa pelo uso de ervas que continham antimicrobianos (AMINOV, 2010).

Na Idade Média, doenças surgiam, supostamente, através dos miasmas, palavra do grego que significa ar ou vapor contaminado, poluição, depois evoluiu para a probabilidade de serem partículas transmissíveis e imperceptíveis, parecidas com as sementes, devido a teoria de Girolamo Fracastoro (1546). Até que no século XIX, foi verificado que as bactérias que eram os responsáveis pelo surgimento de muitas das doenças infecciosas da época (GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Isso ocorreu após Louis Pasteur ter demonstrado que algumas espécies tinham papel fundamental nos processos fermentativos e que eram amplamente presentes no meio ambiente. Foi confirmado depois por cientistas como Robert Koch, cujo trabalho desvendou os microrganismos que causavam a tuberculose, cólera e febre tifoide (GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Devido a todas essas descobertas, a ciência se esforçava em encontrar agentes químicos com ação antibiótica, com o pai da quimioterapia, Paul Ehrlich, como grande responsável pela compreensão de que existiriam substâncias que poderiam atuar na reprodução desses microrganismos, em concentrações toleráveis pelo corpo do paciente, associando conceitos de alvo terapêutico e toxicidade na busca da cura das infecções (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES; *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

Sua ideia foi popularmente chamada de “bala mágica”, pois visaria apenas aqueles os agentes das doenças e não os hospedeiros, conceito criado depois de haver a observação de que a anilina e outros corantes sintéticos da época conseguiam colorir micróbios de forma seletiva (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

Assim, Paul Ehrlich passou a realizar um programa de triagem sistemático em grande escala, uma estratégia fundamental na busca de novas drogas pela indústria

farmacêutica, em 1904, e, assim, tentar encontrar o primeiro antibiótico sintético para combater o agente da Sífilis, uma bactéria espiroqueta chamada de *Treponema pallidum* (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Em 1910, ele conseguiu atingir o seu objetivo, o novo medicamento Salvarsan, um grande sucesso na época, e o Neosalvarsan, uma versão menos tóxica e mais solúvel, mantiveram o status de medicamentos mais prescritos até a chegada da penicilina (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Nos 20 anos posteriores, poucos, mas importantes avanços foram realizados, tanto na descoberta de substâncias de origem sintética quanto de origem natural. Um desses grandes e emblemáticos acontecimentos ocorreu em 3 de setembro 1928, através da descoberta da penicilina por Alexander Fleming (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Ao contrário do que muitos pensam, a penicilina já era, de certa forma, conhecida desde os tempos antigos. Assim como, cepas do fungo *Penicilium* spp. já haviam sido alvos de alguns pesquisadores. Inclusive, a atividade antibiótica desse gênero de fungo havia sido descrita, em 1897 na França, pelo pesquisador Ernest Duchesne (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

O que diferenciou e destacou o trabalho de Fleming, biólogo e farmacologista escocês, foi sua persistência e sua busca mais detalhada. Em 1928, ao voltar das férias, para o laboratório em Paddington, no Hospital St Mary's, encontrou uma placa de Petri com colônias de *Staphylococcus aureus*, que ele havia deixado em uma bancada, contaminada por um fungo hoje denominado como *Penicilium chrysogenum*. O que chamou a atenção foi o padrão de comportamento diferenciado, não se desfez da mesma e investigou mais a fundo (AMINOV, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Fleming verificou que, ao redor da colônia fúngica, as células bacterianas estavam lisadas e aquelas que estavam mais distantes permaneciam intactas. Então, ele passou a obter uma cultura pura do fungo em questão e a testar seu extrato contra várias bactérias patogênicas, com o intuito de obter resultados semelhantes ao

anterior, especialmente contra espécies Gram-Positivas (AMINOV, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Nesse período, havia concluído que o fungo teria excretado alguma substância bactericida, o que tempos depois, em março de 1929, recebeu o nome de Penicilina, Penicilina G ou benzilpenicilina (AMINOV, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

A partir dessas conclusões, Fleming sistematizou um método de triagem para verificação de antibióticos em potencial, produzidos por microrganismos, que acabou por inspirar outros testes usados até hoje (AMINOV, 2010).

Um deles é o teste do Bloco de gelose, cujo objetivo é o possível surgimento de zonas de inibição das bactérias semeadas na placa de Petri, quando existe a produção de antibióticos pelo fungo, quando eles excretam ao seu redor. Essa sistematização auxilia na redução dos custos em comparação a qualquer outro teste em modelos de animais (AMINOV, 2010).

Assim como, motivou o aparecimento de uma nova frente de pesquisas na busca por novas opções de antibióticos, que foi a chamada bioprospecção, que é a prospecção de substâncias com atividade antibacteriana oriundas de culturas de microrganismos, sejam eles fungos ou bactérias (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Em 1934, a proflavina foi introduzida no mercado, com grande importância para os soldados da segunda guerra mundial, já que era usada no tratamento de infecções presentes em feridas profundas. Porém, era altamente tóxica para o tratamento de infecções sistêmicas, o que mostrou a grande necessidade de opções mais eficazes e toleráveis pelos doentes (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Em 1935, Gerhard Domagk e a equipe de químicos da Bayer, Josef Klarer e Fritz Mietzsch, mostraram que o corante vermelho Prontosil possuía atividade antibacteriana, *in vivo*, contra cepas de *Streptococcus* sp (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Foi classificado como um grande marco na quimioterapia antibacteriana, pelo fato de ter sido verificado que, na realidade, ele era um pró-fármaco, com apenas uma parte da molécula possuindo atividade, o que originou uma nova classe de antibióticos sintéticos chamada de sulfas ou sulfonamidas. É considerada a primeira classe efetiva contra infecções sistêmicas, mas que possui algumas desvantagens, como o fato de

ter um espectro de ação mais reduzido (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Doze anos após a descoberta da penicilina, Fleming buscou concretizar uma parceria com inúmeros químicos, enviava para quem pedisse exemplares do fungo usado na tentativa de isolar, purificar e resolver problemas de estabilidade desse composto produzido pelas culturas fúngicas (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018; SILVA, 2018).

A busca para resolver esse problema da molécula era com o intuito de realizar testes clínicos com quantidades adequadas da substância e a certeza de não haver ações cruzadas, originadas por outros compostos que pudessem estar misturados no extrato bruto (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018; SILVA, 2018).

Em 1940, ele estava desistindo da ideia, quando um grupo de Oxford, liderados pelos cientistas Howard Florey e Ernest Chain, publicou um artigo, na qual estava descrito o processo de purificação de uma quantidade suficiente para os testes clínicos (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018; SILVA, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

Em 1945, a produção e distribuição em massa da Penicilina, fez o uso deixar de ser exclusivo dos militares, principalmente, nos envolvidos na segunda guerra mundial, considerada uma “filha da guerra”. Nessa mesma época, o próprio Fleming alertou sobre o surgimento de possíveis bactérias resistentes a esse composto, caso fosse usado em uma quantidade inadequada e/ou por um tempo muito curto (AMINOV, 2010; GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOURKOUTA *et al.*, 2018; NICOLAOU; RIGOL, 2018; SILVA, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017).

Após esse período, foi perceptível um acelerado crescimento na descoberta de novos antibióticos, mais particularmente entre os anos de 1940 e 1960, nomeado como a era de ouro do antibiótico. Nessa época, inúmeros compostos de origem natural foram descobertos graças às triagens realizadas, com a grande maioria como alvo terapêutico as bactérias Gram-positivas, como as classes dos β -lactâmicos, dos aminoglicosídeos, das tetraciclina, dos macrolídeos, dos peptídeos, entre outros

(GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Houve então uma série de derivados naturais introduzidos no mercado, mas poucos de origem sintética, apenas a Isoniazida, trimetropim e metronidazol. No entanto, entre 1960 e 1980, as entradas no mercado mais presentes foram as dos semissintéticos, análogos aos naturais já presentes, principalmente os de origem microbiana, com atuação tanto contra aquelas que seriam Gram-positivas como as Gram-negativas, como os derivados β -lactâmicos derivados aminoglicosídicos e os análogos da tetraciclina (GUIMARÃES *et al.*, 2010; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Entre 1980-2000, a busca por opções de origem microbiana sofreu uma queda, foi substituída em parte por ferramentas como a genômica e a triagem de coleções de compostos, porém não foi a resposta desejada em termos de novas opções terapêuticas, pois houve uma redução alta na identificação dos mesmos, assim como um aumento no casos de resistência bacteriana (AMINOV, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Também é um tempo marcado pela introdução no mercado das fluoroquinolonas sintéticas, assim como alguns baseados em modelos naturais como imipenem e análogos da eritromicina (AMINOV, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

A partir dos anos 2000, poucas opções surgiram para atender a demanda e os problemas de resistência crescentes, até que os programas de bioprospecção foram retomados com mais força nas indústrias farmacêuticas. Alguns medicamentos foram aprovados no FDA, em 2003, do lipodepsipeptídeo natural daptomicina, tigeciclina em 2005, e na década de 2010 o ceftobiprole e a ceftarolina (GOULD, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

3.2.3 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana aos antibióticos caracteriza-se como a capacidade da bactéria de se tornar mais resistente e sobreviver aos mecanismos de ação de certos antibióticos, outrora eficazes, em concentrações que inibem a reprodução ou matam outras bactérias da mesma espécie (BARCHITTA *et al.*, 2020; ZAGUI, 2019; ZAMAN *et al.*, 2017).

O processo como um todo é algo natural, tanto que algumas formas de resistência já estavam em circulação antes de alguns medicamentos se tornarem populares, em virtude da presença de substâncias com essas características nas culturas antigas (BARCHITTA *et al.*, 2020; ZAGUI, 2019; ZAMAN *et al.*, 2017).

O Brasil está entre os 10 países do mundo que mais utilizam medicamentos e cerca de 80 milhões de brasileiros fazem adesão à automedicação. Essa forte adesão deixou o país em 5º lugar entre aqueles que mais realizam essa prática (JÚNIOR *et al.*, 2018).

Dentre as classes medicamentosas, uma das que mais são alvo desses atos inconsequentes, por vezes frutos de uma grande necessidade, já que o sistema de saúde público falha ou apresenta lentidão na assistência médica ou farmacêutica, são os antibióticos (JÚNIOR *et al.*, 2018).

Da mesma forma que no âmbito doméstico, o ambiente clínico/hospitalar enfrenta desafios no manejo de antibióticos, impactando diretamente na taxa de morbidade e mortalidade derivadas do desenvolvimento de bactérias resistentes. Esses desafios estão diretamente relacionados às poucas terapias de fato efetivas, o baixo número do surgimento de alternativas, para atender ambos os casos, capazes de combater bactérias persistentes que se tornam resistentes e a falta de medidas de biossegurança bem executadas (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; LOUREIRO *et al.*, 2016; ZAGUI, 2019).

Algumas dessas medidas seriam o uso de equipamentos de proteção individual, lavagem das mãos, técnicas de assepsia, o não uso do celular em ambientes hospitalares, vigilância de pacientes sob suspeita ou risco de infecção e isolamento aqueles já diagnosticados. Além da assistência farmacêutica às receitas médicas e a atenção farmacêutica, com as orientações necessárias para o tratamento ser realmente eficaz, aos pacientes em uso de antibióticos (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; ZAGUI, 2019).

Esse problema também tem a contribuição do uso veterinário, nem sempre voltado para o tratamento de infecções, o que levou a cadeia alimentar a ser considerada a principal via de transmissão, de bactérias resistentes ou com o perfil de sensibilidade diferenciada, entre os seres humanos e animais (ARAÚJO, 2019; ZAMAN *et al.*, 2017).

Nos Estados Unidos, por volta de 80% dos antibióticos vendidos já chegaram a ser destinados para uso veterinário, porém 90% deles são usados para promover o

crescimento ou como profilaxia das infecções, com apenas 10% voltados para o tratamento das enfermidades de origem bacteriana (ARAÚJO, 2019).

Um estudo em Barcelona sugeriu que cepas de *Escherichia coli* resistentes às quinolonas, isoladas de ¼ das crianças em uma vila rural da cidade, consideradas portadoras fecais dessas cepas, eram oriundas de aves ou suínos, pois as crianças nunca haviam sido expostas a essa classe de antibióticos (ZAMAN *et al.*, 2017).

Naturalmente as bactérias buscam sobreviver ao que as ameaçam, porém o uso inadequado, seja por um tempo mais curto do que o necessário ou pelo uso indiscriminado dos antibióticos, na maioria dos casos sem receita médica (automedicação), com indicação terapêutica incorreta ou para fins veterinários, acelera o surgimento e a disseminação de mecanismos de resistência (ARAÚJO, 2019; BARCHITTA *et al.*, 2020; FURTADO *et al.*, 2019; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017; ZAMAN *et al.*, 2017).

Vários estudos já demonstraram a necessidade de haver uma atenção maior às águas de rios, às águas costeiras, solos, mananciais e principalmente aos esgotos, pela capacidade de serem reservatórios e existirem fatores que auxiliem no desenvolvimento de bactérias multirresistentes, assim como a disseminação e a contaminação do meio ambiente (ARAÚJO, 2019; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; ZAGUI, 2019).

Esse contexto torna-se possível em decorrência dos efluentes hospitalares, urbanos e de origem animal carregados de antibióticos parcialmente metabolizados, que chegam junto com os materiais biológicos excretados. Além dos medicamentos vencidos ou que não estão mais sendo usados, que por falta de ação governamental e conscientização, são descartados nos esgotos urbanos (ARAÚJO, 2019; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; ZAGUI, 2019).

Há ainda os estudos que citam uma relação dessa forma de sobrevivência das bactérias com os cosméticos, em virtude da exposição aos conservantes constituintes das formulações cosméticas, por uma questão de resistência cruzada, ou seja, ao se adaptar ao adjuvante, também ganharia uma forma de resistência a alguns antibióticos (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

A ascendência bacteriana sobre os fármacos antimicrobianos é categorizada como uma grave ameaça à saúde pública, leva ao aumento do período de internação hospitalar, dos gastos hospitalares, sobrecarrega os sistemas economicamente, tanto públicos quanto privados. Também leva ao aumento dos números de morbidades e

de mortalidades, como resultado a redução da produtividade devido ao impedimento da volta ao trabalho(BARCHITTA *et al.*, 2020; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; ZAMAN *et al.*, 2017).

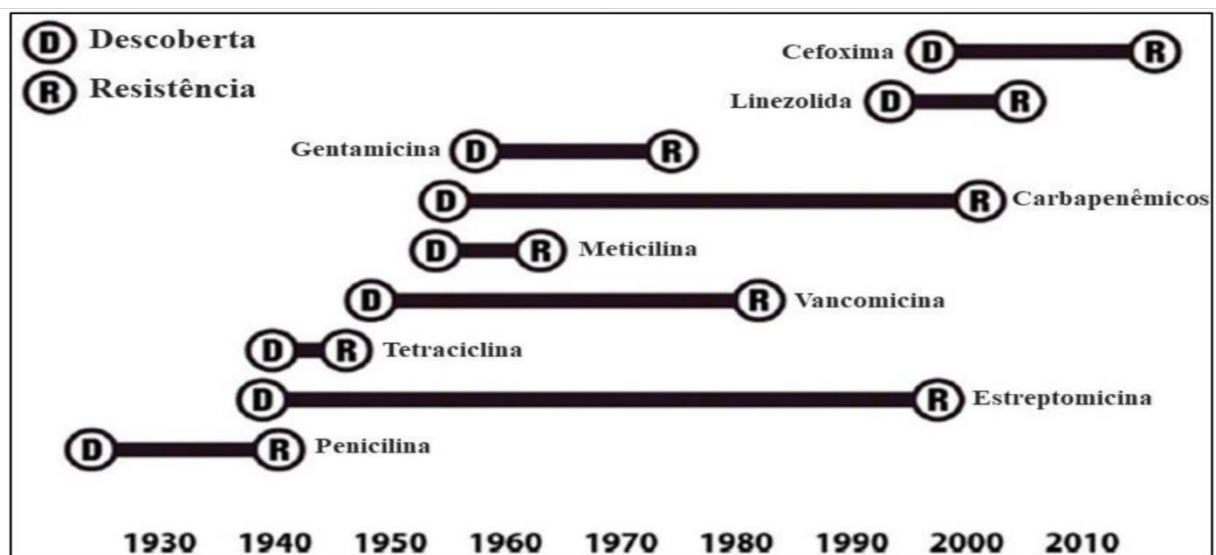
Conhecer os mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos no processo de resistência é de fundamental importância, principalmente, para aqueles que precisam entender como a bactéria se comportam, e, conseqüentemente, desenvolver fármacos capazes de driblar as barreiras impostas por elas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os microrganismos que conseguem sobreviver a atuação do antibiótico, principalmente diante do seu uso incorreto, vencem a primeira etapa da seleção natural induzidas por eles(GUIMARÃES *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017; ZAMAN *et al.*, 2017).

A partir desse momento, alguns eventos podem ocorrer, como o surgimento de mutações, de forma aleatória, em alguns genes, que podem estar presentes no DNA cromossomal, em transposons, pequenos fragmentos de DNA capazes de saltar (móveis) de uma molécula para outra, e em plasmídeos (GUIMARÃES *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017; ZAMAN *et al.*, 2017).

Na Figura 4 está representada, em ordem cronológica, a descoberta de alguns antibióticos e os anos dos primeiros casos de resistência aos seus mecanismos de ação.

Figura 4-Ordem cronológica das descobertas de alguns antibióticos e dos primeiros relatos de resistência bacteriana de cada um



Fonte: Zagui (2019).

É necessário pouco tempo para uma grande população dessas células passarem a ser resistentes àquele antibiótico. Isso, devido ao fato das mutações poderem ser transferidas de forma horizontal entre as bactérias através da conjugação. Nesses casos, a bactéria duplica o plasmídeo portador do gene e o transfere para a outra por um *pili* sexual, ou até pelo processo da transdução, quando um bacteriófago coloca o seu material genético na bactéria receptora (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017; ZAGUI, 2019; ZAMAN *et al.*, 2017).

Assim como de forma vertical, através dos mecanismos normais de reprodução ou por transformação, que trata-se da incorporação de transposons no material genético cromossomal ou nos plasmídeos locais (COSTA.; SILVA JUNIOR, 2017; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017; ZAGUI, 2019; ZAMAN *et al.*, 2017).

Quanto aos mecanismos bioquímicos de resistência bacteriana, eles podem acontecer de forma isolada ou associada, tornando algumas bactérias multirresistentes. Elas podem resistir ao realizar a destruição ou inativação da molécula bioativa, através de enzimas que conseguem degradá-los, devido a presença de alguma estrutura comum a eles. Essa ação pode ocorrer por 3 possíveis reações enzimáticas: Hidrólise, transferência de grupo químico ou processo de oxirredução (ARAÚJO, 2019; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017).

Esses mecanismos bioquímicos prejudicam, principalmente, aos antimicrobianos de origem natural, como as penicilinas e as cefalosporinas. Nesses casos utilizam o anel β -lactâmico, comum a ambos, como alvo de hidrólise pelas enzimas β -lactamases, que possui inúmeras variações, com preferência pelas opções naturais, muito provavelmente, pelo fato de estarem em contato com essas substâncias há mais tempo (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Outra forma de resistir aos ataques dos fármacos é por meio do impedimento da entrada deles no sítio-alvo, no interior da bactéria, ao modificar a abertura e a quantidade de suas porinas, além do conteúdo de lipolissacarídeos e dessa forma, restringir a absorção de algumas moléculas para a região periplasmática (ARAÚJO, 2019; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017).

Esse mecanismo acontece com frequência nas bactérias gram-negativas, devido a constituição de suas paredes celulares, e ganha força associado ao

mecanismo anterior, pois àqueles que ainda conseguem adentrar são inativados pelas enzimas (ARAÚJO, 2019; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017).

Também pode ocorrer o chamado efluxo rápido (ejeção) do antibiótico, trata-se da bactéria, mais comumente gram-negativa, possuir proteínas que funcionam como bombas de efluxo, com papel de retirar de dentro da célula uma certa quantidade de antibiótico que entra na célula, o que não permite que ele alcance uma concentração intracelular efetiva (ARAÚJO, 2019; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017).

Além desses, os genes de resistência podem promover a alteração no sítio-alvo do fármaco, neutralizar o efeito do antibiótico, mas sem modificar de forma significativa as funções celulares. Dessa forma que o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA-*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) passou a impedir a meticilina de ter ação nas suas células, ao modificar uma proteína de ligação a penicilina presente na membrana celular (ARAÚJO, 2019; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017).

Outra possibilidade de resistência é sintetizar uma alta quantidade de enzimas ou quantidades menores das moléculas contra a qual o fármaco age e mais recentemente, verificou-se a formação de biofilme para esse fim também, pois ao se manterem no interior dessa estrutura, acabam protegidos das ações de múltiplos agentes (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

A Organização Mundial de Saúde/World Health Organization -OMS/WHO, em 2017, organizou uma lista de bactérias resistentes aos antibióticos, categorizadas como “prioritárias” por serem ameaças à saúde humana. Dentre os que foram citados, estavam a *Pseudomonas aeruginosa* e espécies da família Enterobacteriaceae (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Serratia spp.*, etc.) resistentes aos carbapenêmicos. Além de serem produtoras de β -lactamases de espectro amplo, fazem parte do grupo de prioridade 1 considerado crítico (WHO,2017; ZAGUI, 2019).

Segundo Glasset *et al.* (2018), cepas de *Bacillus cereus* já mostraram um fenótipo de resistência adquirida a rifampicina, levando a necessidade de ajustes no tratamento e uma maior atenção com os pacientes. Essa espécie bacteriana fica em segundo lugar como agente responsável por surtos de origem alimentar na França e o terceiro na Europa. Os surtos causam vômitos e diarreias, sintomas preocupantes

em pacientes fisicamente frágeis ou debilitados como crianças e idosos (GLASSET *et al.*, 2018; OSIMANI *et al.*, 2018).

Medidas preventivas e de orientação precisam ser reforçadas imediatamente, como a priorização de prescrições com medicamentos de espectro estreito em vez dos que possuem amplo espectro, na tentativa de diminuir as altas taxas de mortalidade e infecções com risco de vida resultantes do cenário atual. Esses problemas são agravados mediante situações inusitadas, como guerras, desastres naturais e até mesmo pandemias, como é o caso novo coronavírus, que contribui no aparecimento de pneumonias nos enfermos (LIMA, 2020; TORTORA *et al.*, 2017; ZAMAN *et al.*, 2017).

A OMS/WHO já emitiu alertas que uma era pós-antibiótica terá como resultado infecções mais frequentes e a evolução de pequenos ferimentos até a morte, se não houver buscas por alternativas eficazes. Cerca de 63.000 pacientes nos Estados Unidos falecem anualmente em decorrência de infecções bacterianas hospitalares, assim como 25.000 morrem, na Europa, devido a atuação de bactérias multirresistentes (ZAMAN *et al.*, 2017).

3.2.4 Dificuldades no surgimento de novas opções terapêuticas

O desenvolvimento da problemática da resistência bacteriana pode ser desacelerada a partir de algumas estratégias como: uso de vacinas para prevenir o aparecimento das infecções; adesão às medidas de controle e prevenção para evitar a disseminação dos microrganismos resistentes entre pacientes, principalmente, a nível hospitalar; e a descoberta, desenvolvimento e inserção no mercado de novas opções terapêuticas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Porém, o mercado de antibióticos enfrenta uma grave redução no surgimento de novas opções terapêuticas, sejam àqueles com novos mecanismos de ação quanto àqueles que sofrem apenas uma modificação molecular, na tentativa de fugir dos mecanismos de resistência bacteriana (FAIR; TOR, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Existem várias causas, dentre elas, a que mais se destaca é a do aspecto econômico, pois, infelizmente, no mundo capitalista em que se vive, existe a necessidade do retorno financeiro imediato após o lançamento de qualquer produto no mercado, então, os medicamentos não têm como fugir dessa realidade (FAIR; TOR, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

As indústrias farmacêuticas investem, por vezes, bilhões ao longo do processo de desenvolvimento e esperam receber, o mais breve possível, o seu respectivo retorno financeiro. Mas, algumas situações que ocorrem após o lançamento no mercado dificultam esse retorno e uma delas é o uso irracional dos antibióticos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Uma vez que são utilizados de forma inadequada, mais rapidamente a resistência aparece e como consequência deixam de ser prescritos. Esse quadro leva as vendas, os lucros e até o tempo de patente diminuir, ou seja, o que levou 7-10 anos para ser lançado, em 7-8 anos começa a ser descontinuado (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Também, devido a rentabilidade, essas empresas preferem investir em medicações para doenças crônicas, por exemplo os anti-hipertensivos, já que o público-alvo compra sempre, pois necessita do tratamento por toda a vida. Enquanto os antibióticos são administrados por tempo limitado, nem sempre prescritos, para diminuir o risco de resistência bacteriana e, por consequente, menos vendidos (BANIN *et al.*, 2017; FAIR; TOR, 2014; FERNANDES, 2017).

Essa política mais cautelosa aumenta o tempo até que uma resistência se manifeste, mas, em compensação, limita o retorno dos investimentos das empresas. Esse baixo lucro diminui o interesse em manter setores de Pesquisa & Desenvolvimento focados em novos antibióticos (FAIR; TOR, 2014; FERNANDES, 2017).

Se o cenário se manter dessa forma, haverá uma enorme repercussão na medicina, pois a maioria dos procedimentos médicos, até aqueles mais simples em questão de complexidade e risco ao paciente, por exemplo pequenas cirurgias, que lesam a pele com cortes, e a quimioterapia, que deixa o paciente imunossuprimido, possuem sempre em seu protocolo a profilaxia através de antibióticos (FAIR; TOR, 2014; FERNANDES, 2017).

Sem mencionar as milhões de mortes, aumento do número de casos de morbidades, entre outros efeitos naturais desse processo, o que indica a enorme necessidade de associar esforços multidisciplinares com altos investimentos financeiros o mais rápido possível, pois são necessários anos de pesquisa e testes que garantam a eficácia e a mínima toxicidade ao organismo humano (FAIR; TOR, 2014; OLIVEIRA, C., 2017; RODRIGUES *et al.*, 2018; SILVA, 2018; ZAGUI, 2019).

As pesquisas de novas moléculas oriundas de fontes naturais, como o solo, de onde já saíram 2/3 dos fármacos naturais dessa classe, vêm sendo retomadas, com os fungos filamentosos sempre como candidatos a produtores (FAIR; TOR, 2014; OLIVEIRA, C., 2017; RODRIGUES *et al.*, 2018; SILVA, 2018; ZAGUI, 2019).

3.3 Fungos

Os fungos são seres eucarióticos, pois apresentam membrana nuclear, que delimitam o espaço nuclear com os cromossomos e nucléolos no seu interior, podem ser haploides ou diploides, dicarióticos, homo ou heterocarióticos (FUCK, 2018; GOYAL *et al.*, 2017; NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017)..

São quimio-heterotróficos, pois não são capazes de captar a energia luminosa e, assim, não sintetizam seu próprio alimento, diferentemente das plantas, que realizam fotossíntese para sintetizar carboidratos (FUCK, 2018; GOYAL *et al.*, 2017; NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Adquirem as substâncias por absorção, através da passagem pelas membranas, mas para obter energia, precisam promover a quebra das ligações químicas presentes nos substratos, através da liberação de enzimas e são capazes de armazenar glicogênio como substância de reserva (FUCK, 2018; GOYAL; RAMAWAT; MÉRILLON, 2017; NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Esses seres são, normalmente, aeróbios ou anaeróbios facultativos, o que permite o seu crescimento em condições adversas, como com baixa concentração de oxigênio, e apenas alguns fungos anaeróbios são conhecidos (FUCK, 2018; GOYAL; RAMAWAT; MÉRILLON, 2017; NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

A maioria desses microrganismos apresenta parede celular composta, principalmente, pelo polissacarídeo quitina (sem peptidoglicano), que é um polímero formado por monômeros de N-acetilglicosamina (NAG), e as leveduras contêm os polissacarídeos *glicano* e *manana*. Além disso, os fungos têm esteróis na constituição da sua membrana e alguns possuem celulose na parede celular (FUCK, 2018; ROCHA, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Constituem um grupo fascinante e alvo de intenso estudo, supõe-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies, na qual apenas 7% dessas foram identificadas. Pertencem ao domínio Eukarya, sua complexidade e características são tão únicas que deram origem a um Reino próprio chamado de Fungi (NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Eles não possuem clorofila em seu interior, podem ser encontrados em todos os tipos de habitat e se dispersam através de vários agentes, como o ar, a água, as sementes, os insetos, os animais e os próprios seres humanos (NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Os fungos podem ser classificados segundo a sua morfologia em unicelulares, que são as leveduras, ou em pluricelulares, que são os fungos filamentosos, tanto os bolores quanto as espécies macroscópicas como os cogumelos (NEGREIROS, 2020; ROCHA, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

As leveduras apresentam-se com colônias pastosas e com a cor creme, branca, preta ou rosa. A reprodução pode ocorrer por brotamento, nesse processo a célula chamada de parental ou mãe forma um broto ou protuberância na sua parte externa. A medida que ele cresce, o núcleo da célula-mãe se divide, um deles vai para o interior do broto, ocorre a síntese da parede celular e, por fim, a separação do broto da sua célula de origem (GOMPertz *et al.*, 2015; TORTORA *et al.*, 2017).

Às vezes, como são formados muitos brotos, eles podem acabar não se separando e formarem uma estrutura parecida com a hifa, mas como não é igual leva o nome de pseudo-hifa. Também podem se reproduzir por fissão, nesse a célula parental forma duas novas células idênticas, nesse caso, essa célula-mãe aumenta de tamanho, ocorre a divisão do núcleo e duas células-filhas são produzidas (GOMPertz *et al.*, 2015; TORTORA *et al.*, 2017).

Os fungos filamentosos são formados por células que se unem no formato de um tubo fino chamado de hifa, estrutura o talo ou o corpo desses microrganismos, e compõem a estrutura vegetativa básica de crescimento. Na maior parte das vezes, são septadas, ou seja, particionadas através de uma parede transversal, denominadas de septos, e geradas através de invaginações nas paredes celulares (FUCK, 2018; NEGREIROS, 2020; TORTORA *et al.*, 2017).

Em alguns fungos, as hifas são chamadas de cenocíticas, pois elas não são septadas, são formadas por células longas, contínuas e com muitos núcleos. Apesar da presença desses septos na maioria das espécies, geralmente, há a presença de

poros nessas estruturas divisórias, que permitem o compartilhamento do citoplasma entre células próximas, então faz esses seres também serem considerados microorganismos cenocíticos (GOMPertz *et al.*, 2015; TORTORA *et al.*, 2017).

O conjunto de hifas, ramificadas e entrelaçadas, forma o micélio, visível a olho nu, conhecido como colônia e como tecido verdadeiro. A porção do micélio que assume funções de obtenção de nutrientes, fixação e crescimento, é chamada de micélio vegetativo, enquanto que a porção diretamente envolvida com a reprodução, que se projeta acima da superfície do meio, na qual o fungo está se desenvolvendo, é denominada de micélio reprodutivo ou aéreo (FUCK, 2018; NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

A reprodução desses fungos pode acontecer de forma assexuada ou sexuada, através da formação de esporos, que é usado, inclusive, na identificação desses seres. Aqueles que apresentam ambas as formas de reprodução são chamadas de fungos perfeitos ou teleomorfos, já os que não têm a reprodução sexual descrita são os chamados imperfeitos ou anamorfos (FUCK, 2018; SANTOS-EBINUMA, 2013; TORTORA *et al.*, 2017).

Os esporos produzidos são diferentes dos endósporos bacteriano, pois além de não exibirem a mesma tolerância a situações extremas e nem a mesma durabilidade, o processo de formação e germinação os diferencia completamente, embora possam se manter viáveis por longos períodos em locais secos ou quentes (TORTORA *et al.*, 2017).

O endósporo é formado pela diferenciação de uma única célula bacteriana e ao germinarem produzem uma única bactéria também, não é considerado um processo reprodutivo, já que não ocorre a multiplicação das células. Ao contrário do esporo fúngico, que após se formar, se separa da célula-mãe e germina, dando origem a um novo fungo filamentosos (TORTORA *et al.*, 2017).

As hifas aéreas formam esporos de diferentes maneiras, de acordo com a espécie a ser considerada. A reprodução sexuada acontece em 3 fases, na qual a primeira é a Plasmogamia, nesse ponto um núcleo haploide, de uma célula doadora (+), consegue entrar no citoplasma de uma célula receptora (-), pois são duas linhagens opostas de uma mesma espécie (TORTORA *et al.*, 2017).

A segunda fase é a Cariogamia, que nada mais é do que a fusão de ambos os núcleos das células envolvidas, origina um núcleo zigótico diploide, para em seguida iniciar a Meiose, nessa terceira fase, esse novo núcleo passa por um processo de

mudança e dá origem a uma célula com núcleo haploide, chamada de esporo sexuado e que é usado na identificação dos filios (TORTORA *et al.*, 2017).

Na reprodução assexuada, os fungos passam pelo processo da mitose e logo depois pela divisão celular, não ocorre a fusão dos núcleos, podem formar dois tipos de esporos e eles são mais facilmente obtidos em laboratório (NEGREIROS, 2020; TORTORA *et al.*, 2017).

Um é o esporangiósporo, que nasce em grande quantidade, cerca de centenas, no interior de uma bolsa chamada esporângio, que por sua vez nasce no ápice de uma hifa aérea denominada de esporangióforo. E o outro é o conidiósporo ou conídio, caracterizado como unicelular ou multicelular. Não é revestido por uma bolsa e nasce em cadeia, na extremidade do conidióforo, que pode ser ramificado ou não. Por vezes, nascem ao longo do micélio vegetativo e são chamados conídio sésseis (GOMPERTZ *et al.*, 2015; NEGREIROS, 2020; TORTORA; *et al.*, 2017).

Esse termo, conídio, significa pó, então eles conseguem de forma prática e fácil serem liberados da cadeia, ao menor movimento, e passam a flutuar no ar como se fossem uma poeira, cumprindo um excelente papel dispersivo (GOMPERTZ *et al.*, 2015; NEGREIROS, 2020; TORTORA *et al.*, 2017).

As células conidiogênicas são as que dão origem aos conídios, que pode ser hialino ou pigmentado, possuindo diferentes formas, como esféricos, fusiformes, cilíndricos, piriformes, com parede rugosa ou lisa. São formados por uma única célula ou podem ter septos em um ou dois planos, aparecem por vezes isolados e outras em grupos (GOMPERTZ *et al.*, 2015).

Existem dois outros esporos classificados como assexuados, apesar da sua formação diferenciada, são os artroconídios, na qual fragmentos espessos, oriundos de hifas septadas, ao serem desmembrados formam células únicas. E tem o blastoconídio, na qual seu processo de produção parte de um broto, que vem da célula parental, desenvolve e forma esse esporo, mas esse segundo não é presente em fungos filamentosos e sim em leveduras (SANTOS-EBINUMA, 2013; TORTORA *et al.*, 2017).

Os bolores formam colônias com morfologias variadas, como algodonosas, pulverulentas, aveludadas entre outros, e com vários pigmentos (GOMPERTZ *et al.*, 2015; TORTORA *et al.*, 2017).

Além disso, existem os chamados fungos dimórficos, que podem crescer em ambas as formas, fenômeno bem presente em espécies patogênicas. Elas possuem

esse comportamento em função da temperatura, pois a 37°C apresentam a forma de levedura e a 25°C apresentam a forma de fungo filamentosos (NEGREIROS, 2020; ROCHA, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

O metabolismo dos fungos é dividido entre a produção de metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são as substâncias químicas essenciais para o crescimento e para a reprodução desses seres, formados ao longo do crescimento vegetativo e quase ao mesmo tempo que as novas células. De tal forma que, a curva de produção acontece de forma semelhante à curva de crescimento celular, como consequência, são considerados derivados de reações metabólicas, que auxiliam na sustentação básica da vida desses microrganismos (FUCK, 2018; ROCHA, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Destacam-se na indústria de alimentos e de ração com os álcoois como o etanol, aminoácidos como a lisina, nucleotídeos flavorizantes como o ácido 5-guanílico, ácidos orgânicos como o ácido láctico, polióis como glicerol, polissacarídeos como a xantana, açúcares como a ribose e vitaminas como a biotina (FUCK, 2018; RAJASEKARAN *et al.*, 2008).

Os metabólitos secundários são produtos com baixa massa molecular, mas com uma estrutura química complexa. Essas substâncias são cruciais no equilíbrio, na regulação e na sobrevivência dos microrganismos, podem ser gerados de diversas formas, em inúmeras situações, consequentemente com diversas funções biológicas (KELLER, 2019; MATUSZEWSKA *et al.*, 2018; NEGREIROS, 2020; PAMPHILE *et al.*, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

A produção desse grupo de metabólitos não é realizada até a chamada trofofase ter sido quase finalizada, que é o momento do crescimento logarítmico, e a fase estacionária ter sido iniciada. Logo depois, na denominada idiofase, o momento que a maioria dessas substâncias são realmente formadas, em virtude do esgotamento de nutrientes e acúmulo de algumas substâncias tóxicas, com aumento natural do estresse oxidativo (NEGREIROS, 2020; TORTORA *et al.*, 2017).

A sua liberação é estimulada como mecanismo de defesa contra alguns patógenos, em interações com outros seres e na adaptação ao meio ambiente, mas também pelo acúmulo dos metabólitos primários com uma quantidade expressiva de células vivas do fungo em questão, no meio em que ele crescer. É construído a partir da modificação de metabólito primários, os acil-CoAs são os blocos de construção

iniciais que alimentam a geração de alguns deles (BILLS; GLOER, 2016; KELLER, 2019; NEGREIROS, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Os genes envolvidos na síntese de metabólitos primários se apresentam dispersos no genoma fúngico, ao contrário dos genes relacionados aos metabólitos secundários. Estes, por sua vez, ficam próximos uns dos outros no genoma, formando os clusters, constituindo o chamado agrupamento de genes biossintéticos (BGC) como a aflatoxina BGC4. São codificadores das enzimas que participam da construção dos metabólitos secundários (KELLER, 2019; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Estes metabólitos podem ser liberados de forma volátil, excretados no meio ambiente, incorporados em elementos estruturais na célula ou até mesmo podem se manter ligados às células. Este grupo é constituído por moléculas complexas, pertencentes a diferentes classes químicas, como policetídeos, terpenóides, peptídeos não ribossomais, alcaloides, peptídeos de ribossomos codificados nuclearmente e moléculas de misturas biogênicas mistas oriundas de vias híbridas (BILLS; GLOER, 2016; FUCK, 2018; NEGREIROS, 2020; PAMPHILE *et al.*, 2017).

As substâncias bioativas oriundas desse metabolismo secundário possuem inúmeras atividades biológicas e, conseqüentemente, um alto poder biotecnológico, principalmente nas indústrias farmacêuticas, cosméticas, alimentícias e agroquímica. São eles os antibióticos, os anti-inflamatórios, os anti-hipertensivos, os antitumorais, os anticolesterolêmicos, os imunossupressores, os pigmentos, os filtros solares, os sideróforos, os inseticidas, os reguladores do crescimento de plantas, os herbicidas e os pesticidas ecológicos (AGUIAR *et al.*, 2015; BILLS; GLOER, 2016; FUCK, 2018; KELLER, 2019; NEGREIROS, 2020; PAMPHILE *et al.*, 2017; RAJASEKARAN *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

A penicilina é um exemplo de substância bioativa, e, ainda serviu de modelo para o desenvolvimento de outras estruturas com esse tipo de atividade, como a ampicilina, a amoxicilina e a metecilina pela indústria farmacêutica (RAJASEKARAN; *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Outros metabólitos de expressiva importância foram a ciclosporina, o primeiro imunossupressor descoberto a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*, que permitiu a viabilização de transplantes, em virtude da diminuição das possibilidades de rejeição dos órgãos nos pacientes que os receberam (GOYAL; RAMAWAT; MÉRILLON, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Assim como a lovastatina e a mevastatina , isolados dos *Aspergillus terreus* e *Penicilium* spp. e capazes de reduzir o colesterol, o aspergiólido, que é um antitumoral excretado pelo *Gliocladium roseum*(GOYAL; RAMAWAT; MÉRILLON, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Como também a Ganodermicina, uma substância produzida pela espécie *Ganoderma lucidum* e com atuação anti-inflamatória e os pigmentos avermelhados rubropunctamina e monascorubramina, liberados por espécies de *Monascus* spp. (GOYAL; RAMAWAT; MÉRILLON, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

3.4 O Gênero *Trichoderma*

3.4.1 Nomenclatura e a História Taxonômica

No passado, uma prática comum na micologia era designar os fungos ascomicetos segundo a forma de reprodução observada. Eles recebiam um nome quando era verificado a fase assexuada (Anamórfica ou Imperfeita) e outro quando era a fase sexuada (Teleomórfica ou Perfeita). Isso acontecia em virtude da falta de recursos mais sofisticados e conhecimentos mais abrangentes que pudessem mostrar que se tratavam do mesmo fungo (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019).

Baseado nisso, o nome *Trichoderma* era usado na fase assexuada, comumente estudada nas colônias em Placa de Petri, e o nome *Hypocrea* era utilizado para a fase sexuada, que dificilmente era visto em cultura pura e sim na natureza, em madeira em decomposição e fungos macroscópicos (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019; RIBEIRO, 2017; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

Essa classificação existia, como se fossem gêneros diferentes, pela dificuldade na avaliação morfológica e pelos estudiosos da época ainda não conseguirem compreender que eram apenas fases da reprodução de um mesmo fungo, observadas em momentos distintos (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019; RIBEIRO, 2017; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

Ao se aprofundarem os estudos e ocorrer o surgimento de novas técnicas, mais sensíveis às pequenas diferenças, como os estudos filogenéticos, foi possível a conexão mais confiável entre as fases de reprodução, um entendimento mais

esclarecido de que em alguns casos analisados, os microrganismos pertenciam a mesma espécie (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019) .

Por um tempo ainda se usava os termos *Hypocrea* e *Trichoderma* como sinônimos, mas com o tempo o primeiro caiu em desuso e o segundo teve a preferência, também considerado por ter sido o primeiro a ser usado em descrições oficiais (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019; RIBEIRO, 2017).

Os fungos referentes ao gênero *Trichoderma* pertencem ao filo Ascomycota, à classe Sordariomycetes, à ordem Hypocrales e à família Hypocreaceae. A primeira descrição foi realizada por Christian Hendrik Persoon, em 1794, e posteriormente revisada por vários micólogos como Mein Rifai e Jhon Bisset, sempre com uma nomenclatura complicada devido ao pleomorfismo existente (ABREU; PFENNING, 2019; LISBOA, 2017; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019; RIBEIRO, 2017; SAMUELS, 2006; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

O gênero *Hypocrea* foi descrito primeiro por Elias Fries, em 1825, baseado em *Sphaeria rufa* Pers, que possuía ascósporos hialinos, e depois se tornou a espécie *Hypocrea rufa*(pers.) Fr., mas na época não foi relacionado com o gênero *Trichoderma*. Em 1865, houve um fato histórico na taxonomia dos fungos conidiais, os irmãos Ludovicus-renatus e Carolus Tulasne registraram que o *Trichoderma viride* era a fase assexuada ou imperfeita de *Hypocrea rufa* (CHAVERRI; SAMUELS, 2003; LISBOA, 2017; SAMUELS, 2006).

No período entre o início do século XX até o final da década de 60 somente o *T. viride* era reconhecido oficialmente, em seguida o gênero recebeu uma nova classificação com 9 agregados de espécies, separados em virtude da observação das diferenças morfológicas da fase assexuada em cultura pura (ABREU; PFENNING, 2019; LISBOA, 2017; MONTE *et al.*, 2019).

Esse termo “agregado” foi escolhido porque representava espécies que podiam ter morfologia e biologia diferentes na fase sexuada, mas parecidas na fase assexuada. Essa demora e poucas descobertas eram em virtude também do baixo interesse nesses fungos, já que até microscopicamente todos eram parecidos. No início dos anos 90, houve a mudança da classificação para 5 seções, mantendo a consideração de como eles se apresentavam na fase sexuada e atingindo cerca de 30 espécies catalogadas (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019).

Com a adesão à filogenia molecular nos anos 2000, não só o nome do gênero foi mais bem estabelecido, como também o número de espécies aumentou de forma considerável, com o uso de sequências parciais de genes compartilhados e bem conservados entre os seres comparados, o que gera uma árvore filogenética a ser analisada (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019).

Isso, devido ao fato das sequências ITS, considerada a região universal na identificação de fungos, não funcionarem tão bem para os *Trichodermas*, pois é muito conservadas em inúmeros microrganismos, não oferece uma boa análise para a diferenciação de espécies muito próximas ou parecidas e de outros ascomycetos (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019).

Dessa forma, o uso do termo “seções” também deixou de ser usado e as espécies são colocadas, informalmente, em grupos monofiléticos ou clados coerentes com a filogenia do gênero, como o Clado Harzianum, o Virens, o Stromaticum, o Viride (incluindo *Carlos Hamatum* e *Koningii*) e o *Longibrachiatum* (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019).

Até 2019, cerca de 256 espécies foram taxonomicamente aceitas, podem ser identificadas por meio de filogenia molecular, não houve atualização da lista, por parte da Subcomissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH), desde o ano de 2015 (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019).

3.4.2 Características Gerais

Os fungos do gênero *Trichodermas* spp. são fungos de vida livre, capazes de habitar os mais diversos solos, como os campos agrícolas, as florestas, os pântanos salgados, desertos e pradarias, em todas as zonas climáticas. Associados à parte orgânica e à rizosfera das plantas, em virtude da utilização eficiente dos seus substratos, alta capacidade de adaptação às diversas condições de umidade e salinidade. Também possuem rápido crescimento e por secretar metabólitos importantes para a sua sobrevivência como antibióticos (ABREU; PFENNING, 2019; MONTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2019; SHARMA *et al.*, 2019).

Apesar de ser um gênero comum nos solos e considerado cosmopolita, ao contrário do que se imagina, somente uma pequena parcela de suas espécies tem esse tipo de habitat ou possui ampla distribuição geográfica (ABREU; PFENNING,

2019; GHAZANFAR *et al.*, 2018; MONTE *et al.*, 2019; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHARMA *et al.*, 2019).

Na verdade, a maior parte tem distribuição restrita e parasita fungos que formam corpos de frutificação macroscópicos, como cogumelos e orelhas-de-pau, além de madeiras em decomposição. Também foram encontrados em fontes inesperadas, como baratas, mexilhões marinhos, mariscos e tripas de cupins (ABREU; PFENNING, 2019; GHAZANFAR *et al.*, 2018; MONTE *et al.*, 2019; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHARMA *et al.*, 2019).

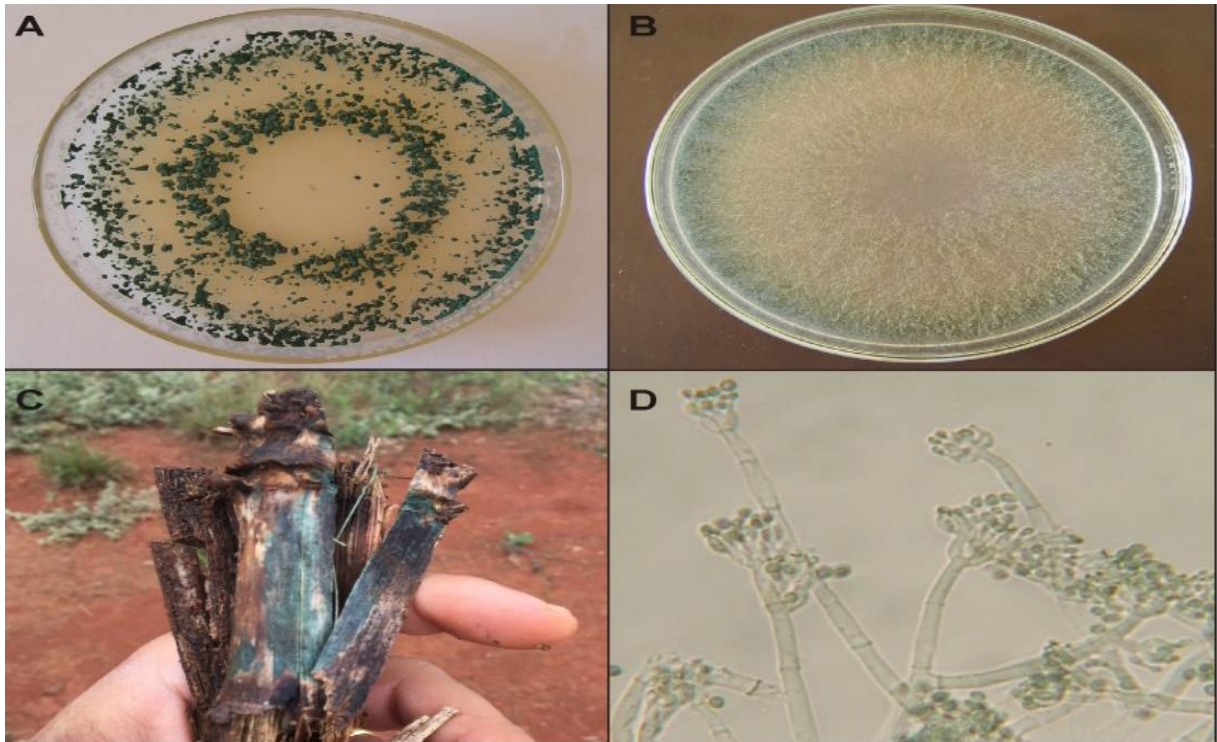
Raramente esses microrganismos são classificados como patógenos, com atuação confirmada em plantas e em seres humanos, como oportunistas em indivíduos com imunossupressão (ABREU; PFENNING, 2019; OLIVEIRA, 2019; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

Nesses últimos casos foram isolados de pacientes que faziam diálise, mais especificamente no efluente peritoneal, assim como em pacientes transplantados, com leucemia, que sofrem de abscessos cerebrais e com HIV. As espécies mais prevalentes e que são bastante relacionadas são a *Hypocreca orientalis* e *T. citrinoviride* Bisset, além das menos frequentes *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* (ABREU; PFENNING, 2019; OLIVEIRA, 2019; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

Esses fungos possuem algumas características macroscópicas e microscópicas próprias, que incluem tanto o crescimento rápido quanto a formação de colônias com micélio aéreo, hialino, algodinoso, com desenvolvimento em tufo e recoberto por conídios, estruturas de reprodução assexuada, de vários tons de verde e mais raramente incolor, em tons de amarelo, cinza ou marrom (ABREU; PFENNING, 2019; LISBOA, 2017; NUNES, 2018; RIBEIRO, 2017; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SILVA *et al.*, 2019).

A coloração da colônia, como um todo, vai depender da tonalidade e da quantidade dessas estruturas de reprodução, como pode ser visto na Figura 5 (ABREU; PFENNING, 2019; LISBOA, 2017; NUNES, 2018; RIBEIRO, 2017; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SILVA *et al.*, 2019).

Figura 5-Imagens macroscópicas e microscópicas de colônias de fungos do gênero *Trichoderma* sp.



Fonte: Abreu e Pfenning (2019).

Nota: **A e B**- Colônias de *Trichoderma* spp. em meio de cultura; **C**- Fungos *Trichoderma* spp. presente em um dos seus substratos naturais; **D**- Conidióforos com fiáides peniciladas e conídios da espécie *T. virens*.

Na fase sexuada de determinadas espécies, aparecem corpos de frutificação com o formato no estilo peritécio, com formação em estromas esverdeados, amarelados, cremes ou amarronzados, que é formado em cima do substrato colonizado como madeiras em decomposição (ABREU; PFENNING, 2019; JAKLITSCH, 2009).

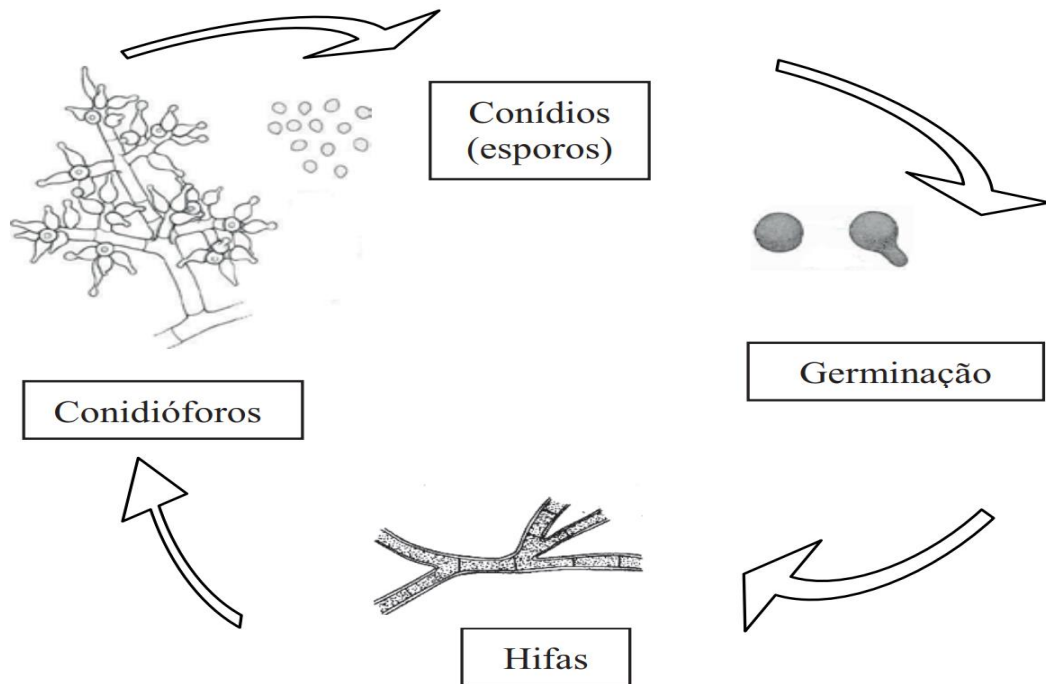
Nesses peritécios, ocorre a formação de ascos cilíndricos, na qual cada um vai conter 8 ascósporos bicelulares, arranjados de forma unisseriada, desarticulados nos ascos, que vão se fragmentar em 16 esporos esverdeados ou hialinos (ABREU; PFENNING, 2019; JAKLITSCH, 2009).

Na fase assexuada, como mostra a Figura 6, ocorre a formação dos conidióforos, que são hifas especializadas, oriundos do micélio vegetativo, que possuem uma alta ramificação com diferentes padrões e há a produção de zonas concêntricas (ABREU; PFENNING, 2019; CHAVERRI; SAMUELS, 2003; FRANCISCO, 2016; LISBOA, 2017; MUKHERJEE *et al.*, 2013; RIBEIRO, 2017).

Esses ramos férteis possuem um arranjo típico, descrito como uma arquitetura piramidal ou cônica, com o ápice possuindo algumas fiáides, podem ser formadas em

tufos ou livres. Em algumas espécies, como por exemplo no *Trichoderma hamatum*, há a produção de prolongamentos estéreis (ABREU; PFENNING, 2019; CHAVERRI; SAMUELS, 2003; FRANCISCO, 2016; LISBOA, 2017; MUKHERJEE *et al.*, 2013; RIBEIRO, 2017).

Figura 6-Fase assexuada dos fungos do gênero *Trichoderma* spp.



Fonte: Machado *et al.* (2012).

As células conidiogênicas ou fiálides são hialinas, podem ter um formato às vezes descrito como uma variação do oval ao subgloboso, ou do cilíndrico ao alongado, outras vezes como forma de cantil, com o centro dilatado, o ápice afilado, normalmente elas divergem a partir da base. Mas em *T. virens* se apresentam agregadas de forma peniciladas, são consideradas marcadores fisiológicos importantes, como pode ser visto na Figura 5-D (ABREU; PFENNING, 2019; CHAVERRI; SAMUELS, 2003; FRANCISCO, 2016; GAMS; BISSET, 2002; NUNES, 2018).

Elas são formadas a partir desses conidióforos, dispostas em verticilos terminais, forma um ângulo com esses ramos, é algo bem característico das espécies desse gênero, assim como o número que essas estruturas aparecem (ABREU; PFENNING, 2019; CHAVERRI; SAMUELS, 2003; FRANCISCO, 2016; NUNES, 2018).

Os conídios também são unicelulares, sub hialinos, com a parede lisa, estriada ou rugosa, com o formato elipsoide, ovoide, globoso, subgloboso ou elíptico-cilíndrico e com um tamanho que pode ser de 3 a 5 μm . Varia de acordo com a espécie e são produzidos em série, acumulados no ápice das fiálides, compactados em massas, aglomerados, soltos ou em meio a gotas cristalinas como em *T.virens* (ABREU; PFENNING, 2019; CHAVERRI; SAMUELS, 2003; FRANCISCO, 2016; GAMS; BISSET, 2002; LISBOA, 2017; NUNES, 2018; RIBEIRO, 2017).

Além disso, a maioria das espécies de *Trichoderma* sp. comumente também se reproduzem assexuadamente através dos clamidosporos, que são estruturas derivadas das hifas, normalmente aparece na sua parte extremidade (terminal) ou no interior delas (intercalar) e são muito importantes para a sobrevivência desses fungos (BISSETT, 1984; CHAVERRI; SAMUELS, 2003; FRANCISCO, 2016; INGLIS *et al.*, 2020; JAKLITSCH, 2009; LISBOA, 2017; MUKHERJEE *et al.*, 2013; SAMUELS, 2006; SILVA *et al.*, 2019).

Essas estruturas assexuadas possuem parede grossa e lisa, variam o seu formato de globoso a subgloboso ou elipsoidal, unicelulares, podem ser hialinos, amarelados, esverdeados ou levemente amarronzados, em algumas espécies possuem diâmetro de 6-15 μm e aparecem em abundância, até em culturas puras, em *Trichoderma virens* (CHAVERRI; SAMUELS, 2003; GAMS; BISSET, 2002; INGLIS *et al.*, 2020; LISBOA, 2017; SAMUELS, 2006).

Sabe-se que são produzidos intensamente em cultivo submerso, mas a compreensão da sua formação e proliferação ainda é incompleta, apesar de terem sido descobertos nos anos 50. Já são usadas comercialmente como propágulos ativos em algumas formulações como SoilGard™ (FRANCISCO, 2016; LOCATELLI *et al.*, 2018; MUKHERJEE *et al.*, 2013).

Possuem excelente atividade no controle biológico, mas não são tão escolhidos para comporem formulações comerciais e auxiliar na agricultura, por sua menor resistência, tanto às condições ambientais, quanto às fases dos processamentos, como a secagem, em comparação aos conídios (FRANCISCO, 2016; LOCATELLI *et al.*, 2018; MUKHERJEE *et al.*, 2013).

A temperatura, o pH e a presença ou ausência de luz são fatores imperativos para o crescimento e esporulação das espécies desse gênero, assim como a interação desses fatores com as suas exigências nutricionais. A faixa de temperatura ótima para o crescimento da maioria das espécies é entre 25°C e 30°C, são poucas

as espécies capazes de crescer e esporular até 40°C (ABREU; PFENNING, 2019; GHAZANFAR *et al.*, 2018; LISBOA, 2017; MASCARIN *et al.*, 2019).

Em relação ao pH, as cepas de *Trichoderma* demonstram ser capazes de crescer e esporular em uma faixa ampla, que vai do pH 2,5 até o pH 7,5, mas a faixa considerada ótima ou ideal vai do pH 4 até o pH 7, um fator tão importante, que chega a afetar diretamente as atividades micoparasitárias (GHAZANFAR *et al.*, 2018).

A luz é considerada como um fator muito significativo para a maioria das espécies, principalmente em relação ao início da conidiogênese, o que faz esse fungo ser descrito como “luz azul”, já que a frequência da luz pode variar no espectro, do ultravioleta até o azul (320nm-550nm), para a produção dos conídios (MASCARIN *et al.*, 2019).

A condição de cultivo mais utilizada é aquela com ciclos alternados de luminosidade, com 12 horas de luz e 12 horas no escuro, chamado de fotoperíodo de 12 horas, pois eles mimetizam às condições do ambiente natural. Os estudos mostram que 24 horas após o início do estímulo provocado pela luz, a geração de conídios se inicia, mas a maturação dos mesmos pode levar até 5 dias conforme cada espécie (MASCARIN *et al.*, 2019).

Os meios de cultura mais utilizados tanto para o crescimento, para a manutenção e para a caracterização de isolados desse gênero de fungo são os meios Batata Dextrose Ágar (BDA), Ágar Aveia, Ágar Extrato de Malte, Ágar de Blakeslee, Ágar Dextrose de Fubá, Ágar Czapek Dox e meio sintético pobre (Spezieller Nährstoffarmer Agar-SNA) (ABREU; PFENNING, 2019; LISBOA, 2017; SIDDIQUEE, 2017).

Após 48h de cultivo, as formações de círculos ou pústulas verdes podem começar a aparecer, em virtude da produção abundante dos esporos/conídios sub hialinos, mas que em massa adquirem o tom verde, na maioria das vezes, o que gera uma aparência granular ou pulverulenta à colônia (ABREU; PFENNING, 2019).

Em caso de necessidade de lâminas, prepará-las com colônias recém cultivadas, com 2 a 3 dias, e o novo inóculo precisar ser de locais próximos à margem da colônia, por ser a região mais nova, na tentativa de evitar que venha uma quantidade excessiva de conídios, o que pode atrapalhar a visualização detalhada dos conidióforos (ABREU; PFENNING, 2019; RIBEIRO, 2017).

Isso tudo permite seu fácil reconhecimento como sendo do gênero, tanto em placas como em substratos naturais, mas não a nível de espécies, pois muitos

apresentam diversas semelhanças, até a nível genético, que só um estudo mais aprofundado para diferenciar (ABREU; PFENNING, 2019; RIBEIRO, 2017).

3.4.3 Metabólitos Secundários e a Importância do gênero

Os microrganismos do solo, como os do gênero *Trichoderma*, se destacam na produção de compostos biologicamente ativos, como os peptídeos não ribossômicos, os policetídeos, os terpenóides e as pironas, de considerável valor econômico, sendo eles sintetizados por via ribossomal ou não, caracterizados como voláteis ou não (AGUIAR *et al.*, 2015; AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016; MUKHERJEE *et al.*, 2012).

As atividades biológicas mais comuns são os antibióticos, as toxinas, os indutores de competição ecológica, os promotores de crescimento e os que auxiliam na simbiose, assim como, são capazes de produzir colorantes (AGUIAR *et al.*, 2015; AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016; MUKHERJEE *et al.*, 2012).

Os fungos desse gênero são pesquisados desde o século XVIII, inúmeras características já foram descobertas, o que permite a sua utilização em várias áreas, com destaque para a agricultura, ramo na qual já é bastante comercializado, mas muitos estudos ainda são necessários e estão acontecendo para um maior conhecimento e aplicação desses fungos (ABREU; PFENNING, 2019; BETTIOL *et al.*, 2019; PANSA, 2017).

Segundo Mukherjee, Horwitz e Kenerley (2012), os fungos do gênero *Trichoderma*, apesar de serem uma rica fonte de metabólitos secundários e possuírem diversos genes relacionados à biossíntese, requerem cautela na utilização desses fungos. Por exemplo, no biocontrole, as substâncias a serem produzidas por eles precisam ser muito bem conhecidas, já que algumas delas, oriundas de certas cepas, podem ser tóxicas para as plantas e para os seus consumidores, recomenda-se dessa maneira evitar a utilização, dessas cepas em questão, para esse fim .

Além dos odores de mofo ou bolor que são comumente produzidos por alguns representantes, as espécies *Trichoderma viride*, *Trichoderma theobromicola*, *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma harzianum* aparecem na literatura associadas a um aroma doce, semelhante a um odor de coco, devido a produção do composto volátil 6-pentil- α -pirona (KLEIN; EVELEIGH, 2002; SAMUELS *et al.*, 2002; SAMUELS, 2006; SIDDIQUEE, 2017; SILVA *et al.*, 2019; WAGHUNDE *et al.*, 2016).

Esse metabólito, por ser aprovado pela agência americana Food and Drug Administration-FDA, já é usado como aromatizante nas indústrias alimentícias. Também é conhecido por ser ativo na inibição de fitopatógenos, como o patógeno *Fusarium oxysporum*, por gerar uma pigmentação amarela e por ser mais um fator usado na identificação de algumas espécies (JUNIOR *et al.*, 2019; PANSA, 2017; RAMOS *et al.*, 2008; SAMUELS, 2006; SAMUELS *et al.*, 2002; SIDDIQUEE, 2017; SILVA *et al.*, 2019; WAGHUNDE *et al.*, 2016).

Os conídios de algumas espécies são pigmentados, como consta no item 3.2.2, e apesar da sua natureza exata, dos genes e dos caminhos de sua formação ainda precisarem ser melhor determinados, eles possuem uma grande importância na sobrevivência desses fungos (MUKHERJEE *et al.*, 2013; MUKHERJE *et al.*, 2012; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; STEYAERT *et al.*, 2013).

Devido a exposição do fungo à radiação UV, esses genes são ativados e produzem pigmentos, por possuírem o papel de proteger os conídios dos comprimentos de onda curtos da radiação UV, de forma semelhante a um protetor solar (MUKHERJEE *et al.*, 2013; MUKHERJE *et al.*, 2012; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; STEYAERT *et al.*, 2013).

No entanto, alguns desses microrganismos também são capazes de secretar diversos pigmentos para o meio, com cores que variam do amarelo-esverdeado brilhante ao avermelhado. Esses pigmentos difusíveis são melhor observados em meios de cultura relativamente ricos, como o Ágar Batata-Dextrose, em comparação com outros meios, o que mais se destaca (CELESTINO, 2013; FRANCISCO, 2016; GAMS; BISSET, 2002; NEVES, 2016; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SIDDIQUEE, 2017).

O *T. viride* libera um corante marrom identificado como Furfural, depois de 5 a 8 dias de incubação em meio líquido, que pode ser usado na indústria alimentícia, mais especificamente na panificação e nas bebidas, atua não só como corante, mas também como agente aromatizante. Ele também produz um corante amarelado chamado de Viridina e outro esverdeado, solúvel em água, não muito bem caracterizado (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016; CHITALE *et al.*, 2012; NEETHU *et al.*, 2012).

Segundo Gupta *et al.* (2013) e Silva, W.S. (2013), o *T. virens* produz corantes amarelos, que podem ser usados na indústria têxtil, pois conseguem corar fibras têxteis, como seda e lã, com uma boa resistência à lavagem e à fricção, e são

classificados como não tóxicos para a pele humana e como antifúngicos. E segundo Akilandeswari e Pradeep (2016), esses corantes são chamados de Viridol, Virone e Viridin.

O *Trichoderma reesei*, segundo Lopes (2011), é um dos fungos filamentosos que possuem o status GRAS (Generally recognized as safe), de acordo com o FDA, em virtude do seu histórico na indústria de alimentos e de bebidas, o que permitiu a grande experiência na sua manipulação.

As espécies de *Trichoderma* também estão entre os microrganismos mais investigados na área do biocontrole, que é definido como a diminuição da densidade do inóculo ou da ação de um patógeno ou parasita, produtor de doença nas plantas e seus derivados. Pode ser feito através de um ou mais seres, naturalmente ou por manipulação do ambiente ou do hospedeiro (FENTA *et al.*, 2019).

A escolha do controle biológico é tendência mundial devido a classificação como “eco-friendly” ou ecologicamente correta, e uma alternativa eficaz ao uso de agrotóxicos, que são capazes de tirar a saúde dos humanos, das plantas e até dos solos. O uso de seres antagonistas, como os fungos e as bactérias, são bastante populares, pois não produzem resíduos tóxicos, nem para os seres humanos nem para o meio ambiente, possuem uma forma de aplicação considerada segura, com produção econômica e fácil de ser realizada (FENTA *et al.*, 2019).

Os fungos do gênero *Trichodermas* se destacam por sua plasticidade ecológica, fácil produção em larga escala e por possuírem muitos mecanismos que podem ser explorados nesse campo. Ao colonizarem às rizosferas das plantas, com o intuito de obter nutrientes, eles protegem às mesmas de várias maneiras, como por exemplo através da competição por nutrientes com os fitopatógenos (ABREU; PFENNING, 2019; FENTA *et al.*, 2019; INGLIS *et al.*, 2020; MONTE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; WAGHUNDE *et al.*, 2016).

Nesse aspecto, ele busca crescer mais rápido ou usar a fonte de alimento com mais eficiência do que o outro microrganismo, o que permite que ele não consiga se desenvolver e parasitar aquela planta (ABREU; PFENNING, 2019; FENTA *et al.*, 2019; INGLIS *et al.*, 2020; MONTE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; WAGHUNDE *et al.*, 2016).

Também pode realizar a antibiose, na qual as espécies de *Trichoderma* podem secretar compostos, antibióticos e antifúngicos, que são capazes de diminuir ou até mesmo inibir o crescimento do patógenos, por toda região circundante à rizosfera

(ABREU; PFENNING, 2019; FENTA *et al.*, 2019; INGLIS *et al.*, 2020; MONTE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; WAGHUNDE *et al.*, 2016).

Assim como uma melhor resistência aos patógenos, tanto sistêmica quanto local, e tolerância ao estresse abiótico, através do estímulo da produção de uma substância química por parte da planta, fazem com que ela consiga se proteger, provocam nelas a chamada resistência induzida (ABREU; PFENNING, 2019; FENTA *et al.*, 2019; INGLIS *et al.*, 2020; MONTE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; WAGHUNDE *et al.*, 2016).

Esses fungos são capazes de realizar o chamado micoparasitismo, na qual ele pode se alimentar da espécie patogênica e também conseguem crescer de forma endofítica na planta, apoiam o seu crescimento, ao causar a melhor aquisição das fontes de nitrogênio, a promoção do seu crescimento e maior eficiência fotossintética (ABREU; PFENNING, 2019; FENTA *et al.*, 2019; INGLIS *et al.*, 2020; MONTE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; WAGHUNDE *et al.*, 2016).

As espécies mais utilizadas para esse fim são *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. asperelloides* e *T. gamsii*, e já existe comprovada eficiência contra os microrganismos dos gêneros *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Verticillium*, entre outros nesse campo (FRANCISCO, 2016; INGLIS *et al.*, 2020).

Segundo Bettioli *et al.* (2019), alguns produtos comercializados à base de *Trichoderma* são o Asperello T 34 Biocontrol, que possui como princípio ativo o *Trichoderma asperellum* T34, atua contra o *Fusarium oxysporum* em plantas ornamentais, cultivadas em casa de vegetação, e no controle de *Pythium* em cultivos de tomates protegidos, de pimenta e berinjela. É comercializado através de um pó-molhável na concentração de 1×10^9 UFC/g, na qual o modo de ação é através da competição por espaço e nutriente, o micoparasitismo e a indução de resistência na planta.

Outro produto também comercializado é o BIOREGULAX WP, cujo ingrediente ativo é o *Trichoderma harzianum*, visa o tombamento causado por *Rhizoctonia solani*, em cultivos de arroz, como também o mofo branco, cujo agente é a *Sclerotinia sclerotiorum* em crisântemo. O modo de ação dessa formulação é através de antibiose, competição por nutrientes e micoparasitismo (BETTIOLI *et al.*, 2019).

Enzimas importantes também são secretadas por esses fungos, com a finalidade de realizar a degradação e lise da parede celular de fungos patogênicos,

como por exemplo as exoglucanases, endoglucanases, celobiase, quitinase, lipases, amilases, proteases. Essa necessidade existe para eles poderem viver em ambientes com diferentes condições e realizar essa ação antifúngica, por isso eles possuem uma grande quantidade de genes que codificam essas enzimas (FRANCISCO, 2016; GELLEN *et al.*, 2014; MONTE *et al.*, 2019).

Existem aquelas com alto poder de degradação de polissacarídeos como a celulose, presente em bagaço de cana-de-açúcar e na madeira. São importantes e de grande interesse para as indústrias de biocombustível, de alimentos, têxtil e de papelaria, mas também para o meio ambiente, pois conseguem decompor restos de culturas e atuam no ciclo de matéria orgânica do solo (ABREU; PFENNING, 2019; FRANCISCO, 2016).

Segundo consta em Gellen *et al.* (2014), uma grande quantidade de antibióticos é produzida por esse gênero, como por exemplo a própria viridina, anteriormente citada, mas também a trichodermina, a suzucacilina, a alameticina e a demadina, com alguns deles sendo voláteis. Esses autores realizaram testes com isolados de *T. harzianum*, que se mostraram capazes também de atuar contra microrganismos de importância clínica como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Rhodotorula sp.*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida lusitanae*.

De forma semelhante, Leelavathi, Vani e Reena (2014) verificaram que extratos das cepas de *T. harzianum* apresentaram atividade também contra o *S. aureus* e *E. coli*, mas também contra bactérias do gênero da *Klebsiella*, corroborando com os resultados da Oliveira (2019)), cujos extratos obtidos apresentaram compostos que mostraram eficácia na inibição do *S. aureus*.

De acordo com os autores Shi *et al.* (2017), em seus estudos extratos de cultura do *T. koningiopsis* também inibiram o patógeno humano *E. coli*. Já os autores Saravanakumar *et al.* (2018) verificaram que uma fração metanólica, nomeada como F41, do micélio de uma cepa identificada como KNUP001, do *Trichoderma atroviride*, apresentou atividade antibacteriana e antioxidante significativa, além de não ser citotóxica para células VERO.

Segundo Touati *et al.* (2018), a cepa LSBA1 do *Trichoderma orientale*, isolada de uma esponja marinha do mar mediterrâneo chamada *Cymbaxinella damicornis*, apresentou atividade inibitória contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *S.aureus*, *S. epidermidis*, *E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S.*

enteritidis, e contra cepas da levedura *C. albicans*. O composto antifúngico foi purificado, denominado como Hyporientalin A e identificado como análogos ao peptaibol Longibrachin-A-II.

O gênero *Trichoderma* também é tolerante a vários poluentes como metais pesados, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos o que traz um grande potencial para controlar microrganismos patogênicos de vegetais em solos poluídos. Para facilitar a tolerância ao estresse metálico que ele pode vir a sofrer, ao tentar realizar essa forma de controle, ele promove nas plantas o aumento da produção de biomassa radicular, hiperacumulação de compostos tóxicos nos tecidos dos vegetais, maior disponibilidade e eficiência do uso de nutrientes e uma proteção contra danos oxidativos (TRIPATHI *et al.*, 2017).

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção e Reativação de isolados de *Trichoderma* spp.

Inicialmente, houve uma pré-seleção de 20 culturas de fungos do gênero *Trichoderma*, cedidas pela Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM, pertencente à Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Amazônia) (Tabela 2).

O critério dessa pré-seleção foi a produção visual de colorantes por esses 20 fungos, em cultivos submersos, realizados por Oliveira (2019), quando pesquisava a capacidade desses serem em produzir antibióticos para *Staphylococcus aureus*. Os testes foram realizados no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia- LEBMAM, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA.

Tabela 2-As 20 Culturas de Fungos *Trichoderma* spp. pré-selecionadas para o estudo

Nº de Registro da Cultura	Gênero e Espécie*	Local de Isolamento
CFAM 1217	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Água Município Rural de Serra Baixa-Iranduba/AM
CFAM 1305	<i>Trichoderma</i> sp.	Água Município Rural do Lago do Limão-Iranduba/AM
CFAM 1210	<i>Trichoderma harzianum</i>	Água Município Rural de Serra Baixa – Iranduba/AM
CFAM 1215	<i>Trichoderma</i> sp.	Água Município Rural de Serra Baixa-Iranduba/AM
CFAM 1145	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1172	<i>Trichoderma harzianum</i>	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1157	<i>Trichoderma virens</i>	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1142	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1144	<i>Trichoderma virens</i>	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1151	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1158	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1135	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1162	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 1164	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 0792	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Cigs – Manaus/AM
CFAM 0837	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Cigs – Manaus/AM
CFAM 1163	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo Reserva Mamirauá – Tefé/AM
CFAM 0441	<i>Trichoderma viride</i>	Água Cigs – Manaus/AM
CFAM 1378	<i>Trichoderma</i> sp.	Água Município Rural do Lago do Limão-Iranduba/AM
CFAM 1379	<i>Trichoderma</i> sp.	Água Município Rural do Lago do Limão-Iranduba/AM

Fonte: Oliveira (2019).

Esses 20 isolados foram reativados segundo Mutawila *et al.* (2016) modificado, em placas de Petri, com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). O cultivo ocorreu durante 5 dias, na presença de luz 24 horas por dia e em temperatura ambiente (± 28 °C). O BDA era composto de infusão de 220g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar para cada 1 L de água (GHAZANFAR *et al.*, 2018).

Desses isolados, 5 foram escolhidos para dar prosseguimento ao estudo. Os critérios de seleção foram aqueles que apresentaram maior formação de esporos no período da reativação, pois é uma estrutura necessária para a preparação do inóculo, e a produção de cores mais expressivas em meio líquido nos estudos preliminares.

4.2 Fermentação Submersa

4.2.1 Preparação do Inóculo

Os 5 fungos selecionados foram novamente cultivados em meio sólido BDA, da mesma forma que na reativação no item 4.1, para ocorrer a esporulação na cultura. Após o período de 5 dias de cultivo em BDA, como pode ser visto na Figura 7., foram adicionados 5 mL de água destilada estéril, em cada placa, com o auxílio de uma micropipeta.

Os esporos foram misturados, de forma suave, à água para ficarem suspensos e depois removidos da superfície da cultura, com o uso da mesma micropipeta, para tubos Falcon e agitadas em vórtex. Dessa forma, a suspensão de esporos foi preparada, pois é necessária para a padronização do inóculo (MONGA, 2001; OLIVEIRA, 2019; SHENTU *et al.*, 2013).

Em seguida, foi retirada uma alíquota, de cada uma delas, para a padronização, que ocorreu através da contagem dos esporos presentes na amostra, em uma câmara de Neubauer ou hemocitômetro. Realizou-se diluições, quando necessário, para a obtenção do volume na concentração desejada do inóculo, correspondente a 1×10^5 esporos/mL (MONGA, 2001; OLIVEIRA, 2019; OLIVEIRA, L. 2017; SHENTU *et al.*, 2013; ZEHRA *et al.*, 2017).

Figura 7-Colônias de *Trichoderma spp.* cultivadas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), por 5 dias e com luz 24 horas/dia



Fonte: A Autora (2020). Nota: A: *Trichoderma harzianum* CFAM 1210; B: *Trichoderma sp.* CFAM 1162.

Os inóculos padronizados eram inseridos em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura caldo Batata-Dextrose-BD esterilizado (mesma composição do item 4.1, sem o ágar), sempre em triplicata (MONGA, 2001; OLIVEIRA, 2019; OLIVEIRA, L. 2017; SHENTU *et al.*, 2013; ZEHRA *et al.*, 2017).

4.2.2 Condições do cultivo em meio líquido

Os cultivos submersos foram preparados de acordo com as condições descritas na Tabela 4., variando uma condição por vez. Então, primeiro realizou-se os cultivos com as diferentes temperaturas 27°C, 37°C e 47°C com pH 6,0 e ausência de luz, depois com os diferentes pHs 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e por fim com os diferentes níveis de exposição a luz sendo ausência de luz, pouca luz e muita luz.

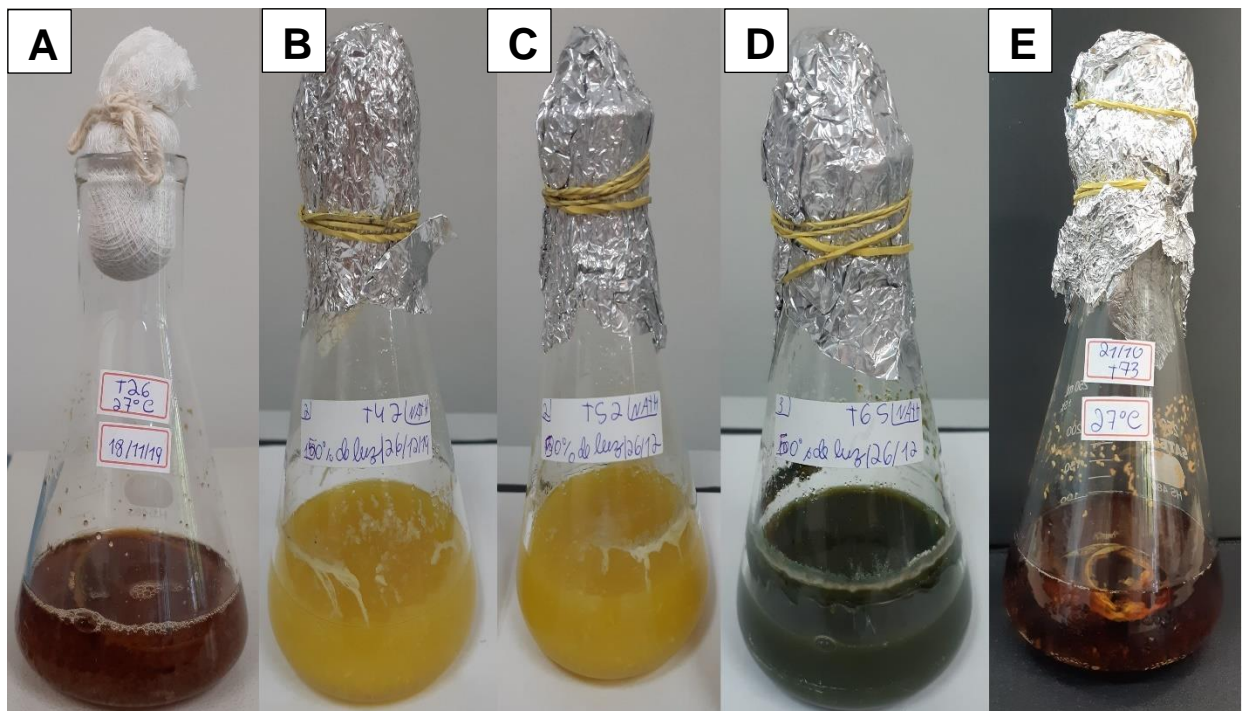
Todos os cultivos foram realizados em triplicata e mantidos em um shaker orbital de chão, com agitação contínua a 150 rpm por 8 dias. Após esse período, os meios fermentados foram armazenados em freezer, a -18°C até a realização da filtração e dos ensaios. Alguns desses caldos pós-cultivo podem ser observados na Figura 8.

Tabela 3-Variação das condições dos cultivos submersos das cepas de *Trichoderma spp.* selecionadas para o estudo

pH	Temperatura	Intensidade da Luz
4,5 ± 0,2	27 ± 2°C	Ausência de Luz
5,5 ± 0,2		
6,5 ± 0,2		
7,5 ± 0,2		
6,0 ± 0,2	27 ± 2°C	Ausência de Luz
	37 ± 2°C	
	47 ± 2°C	
	27 ± 2°C	Pouca luz*
		Muita luz*

Fonte: A autora. Nota: * Muita luz (3,42 PAR (7,6 watts.m⁻²)) e pouca luz (2,12 PAR (4,71 watts.m⁻²)).

Figura 8-Meios de cultura (Caldo BD) fermentados pelas 5 cepas *Trichodermas spp.* selecionados



Fonte: A Autora (2020). Nota: A= *Trichoderma harzianum* CFAM 1210; B= *Trichoderma virens* CFAM 1144; C=*Trichoderma* sp. CFAM 1162; D= *Trichoderma* sp. CFAM 792; E= *Trichoderma* sp. CFAM 1163

4.3 Avaliação da produção de biomassa fúngica (Peso da massa seca)

O peso da matéria seca foi realizado segundo o protocolo presente em Teixeira *et al.* (2011) e Kischkel *et al.* (2018) com adaptações. Primeiro, os papéis de filtro quantitativos QUANTY[®] JP42-Faixa Azul, 12,5 cm f, 80g/m², permeabilidade ao ar 3 l/s m² e com a maioria dos poros 8 µm foram identificados. Em seguida, eles foram desidratados em estufa a 70°C até peso constante e, depois, armazenados em um dessecador com sílica gel.

Posteriormente, cada filtro de papel foi colocado dentro de um funil de Büchner, acoplado a um Kitassato e a uma bomba a vácuo para se iniciar a filtração dos caldos fermentados (Figura 9.). Com a finalização dessa etapa, os papéis de filtros com a biomassa foram retirados e levados para a estufa, mantidos à 70°C por 24 horas e após esse período, foram pesados de hora em hora até peso constante.

Destaca-se que ao se retirar um papel de filtro da estufa era necessário transferi-los para um dessecador com sílica gel, a fim de que eles resfriassem por cerca de 10 minutos e não absorvessem umidade nesse momento. Dessa forma, evitava-se interferências nos pesos obtidos. Os filtrados resultantes desse processo foram armazenados em freezer a -18°C para posteriores avaliações.

Figura 9-Processo de filtração a vácuo de meios de cultura fermentados por diferentes fungos



Fonte: A Autora (2020).

Para a determinação do quanto de biomassa foi gerada utilizou-se a seguinte equação:

$$MM = Pf - Pi,$$

Onde:

MM = massa micelial

Pi = Peso do papel filtro seco, antes da filtração;

Pf = Peso do papel filtro seco após a filtração (Papel de filtro+ micélio fúngico)

4.4 Avaliação da produção de colorantes

Os meios fermentados, resultantes do item 4.3, foram descongelados e novamente filtrados com um filtro de seringa estéril FILTRILO[®]. Ele era constituído por uma membrana de Polietersulfona – PES, com tamanho de poro de 0,45 µm e diâmetro de 25 mm, a fim de ser retirada qualquer partícula fúngica residual. Em seguida, foram separados os volumes necessários tanto para esse ensaio quanto para a avaliação da atividade antibacteriana, caso o fungo tivesse sido selecionado.

Avaliou-se a produção de colorantes extracelulares através das absorvâncias apresentadas no Espectrofotômetro UV/VIS (Modelo: Biospectro[®] SP220-Digital). Dessa forma, foi possível verificar o efeito que a modificação do pH, da temperatura e da exposição a luz promoveram na produção desses metabólitos por esses fungos, pois as absorvâncias aumentam ou diminuem de forma proporcional a intensidade da cor presente (BROWN *et al.*, 2005).

Porém, antes do início da análise espectral das amostras, realizou-se um escaneamento de varredura para identificar a máxima absorvância (λ_{max}) de cada colorante, ou seja, qual comprimento de onda eles absorviam mais (BROWN *et al.*, 2016; CELESTINO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2014; SANTOS, 2018).

A varredura foi feita partindo de 400 até 750 nm, sempre com cubetas de vidro, com o branco constituído apenas do meio de cultura e com amostras do cultivo de 27°C, pH 6,0 e ausência de luz de todos os fungos (BROWN *et al.*, 2016; CELESTINO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2014; SANTOS, 2018).

O comprimento de onda que as amostras demonstraram ter absorvância máxima foi o de 400 nm. Em seguida, todos os extratos brutos, dos diferentes fungos e condições de cultivo, foram avaliados quanto a sua absorvância em 400 nm, com

os brancos sendo também os meios de cultura, sempre com o pH correspondente ao do meio no início do cultivo. Os resultados foram expressos em termos de Unidade de Absorbância (UA), na qual se multiplicou a absorbância pelos fatores de diluição utilizados quando necessários (KANG *et al.*, 2014; SANTOS, 2018).

4.5 Avaliação da atividade antibacteriana

4.5.1 Reativação e manutenção de amostras clínicas bacterianas

Para a análise da atividade antibacteriana, foram usadas 4 espécies bacterianas de interesse médico (Tabela 3). Elas foram cedidas pela Coleção de Bactérias da Amazônia-CBAM, pertencente à Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD, da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ-Amazônia. Tanto para reativar quanto para realizar a manutenção foi utilizado o meio Ágar Mueller-Hinton, na qual os patógenos foram inoculados a 37°C por 24 horas.

Tabela 4-Amostras clínicas de bactérias utilizadas nos testes de atividade antibacteriana dos isolados de *Trichoderma spp.*

Nº de Registro da Cultura	Gênero e Espécie*
CBAM 0001	<i>Escherichia coli</i>
CBAM 0549	<i>Bacillus cereus</i>
CBAM 0665	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CBAM 0672	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Fonte: A Autora (2020)

4.5.2 Screening pelo Método do Bloco de Gelose

Realizou-se uma triagem com as 5 cepas de *Trichoderma spp.* selecionadas, utilizando-se uma avaliação qualitativa chamada de Método do Bloco de Gelose, ou Teste de difusão em ágar, proposta por Ichikawa *et al.* (1971). Esse ensaio teve como objetivo verificar quais isolados eram produtores de compostos antibióticos contra as

4 bactérias selecionadas: *Escherichia coli* CBAM 0001, *Bacillus cereus* CBAM 0549, *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 0665 e *Klebsiella pneumoniae* CBAM0672 (Item 4.5.1).

Nessa avaliação, o composto bioativo, quando presente, difunde-se no ágar e age contra o microrganismo, impedindo o seu crescimento, com consequente formação de um halo a ser medido quanto ao seu diâmetro (FERREIRA, H. *et al.*, 2016; OLIVEIRA, 2019).

Inicialmente, as cepas de *Trichoderma* spp. foram cultivadas em meio BDA, a 28°C por 7 dias. Enquanto isso, foram preparados os pré-inóculos, com os 4 patógenos, que foram incubados em placas de Petri (90mm x15 mm) com ágar Müeller-Hinton, a 37°C por cerca de 24 horas. Esse procedimento teve como objetivo formar suspensões celulares, que foram padronizadas e utilizadas como fontes dos inóculos bacterianos nesse ensaio (ICHIKAWA *et al.*, 1971; OLIVEIRA, 2019).

Após as 24 horas, foram preparadas as suspensões celulares padronizadas com turbidez semelhante à coluna 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando-se solução salina 0,85% esterilizada e colônias isoladas oriundas do pré-inóculo (FERREIRA, H., *et al.*, 2016; ICHIKAWA *et al.*, 1971; OLIVEIRA, 2019).

A partir desse preparo, foram retirados 150 µL e semeados com auxílio de um swab esterilizado, ao longo das superfícies dos meios de cultura Ágar Müeller-Hinton. Essa etapa era necessária para que as bactérias, ao crescerem, pudessem formar uma camada homogênea semelhante a um “tapete” (FERREIRA, H., *et al.*, 2016; ICHIKAWA *et al.*, 1971; OLIVEIRA, 2019).

Em seguida, coincidindo com o sétimo dia de crescimento das culturas de *Trichoderma* spp., foram removidos três fragmentos de ± 8 mm de diâmetro, em formato circular (plug), de cada um dos 5 fungos e colocados nas superfícies das placas onde as bactérias foram semeadas (ICHIKAWA *et al.*, 1971; OLIVEIRA, 2019).

Além disso, no centro de cada uma das placas, foram colocados discos de papel de filtro, com Cloranfenicol (5mg/mL), para agirem como o controle positivo do ensaio (ICHIKAWA *et al.*, 1971; OLIVEIRA, 2019).

Também foi inserido um plug só com o BDA, com o intuito de verificar se o meio de cultura dos *Trichodermas* estaria contaminado ou promovendo algum efeito inibitório sobre os patógenos. Após esse processo, todas as placas já preparadas

foram incubadas a 37°C por cerca de 24 horas (ICHIKAWA *et al.*, 1971; OLIVEIRA, 2019).

A análise de quais fungos apresentavam atividade antibacteriana aconteceu através da presença ou ausência de halos de inibição, com as respectivas medidas dos diâmetros, obtidos através de um paquímetro digital (Modelo: Digimatic Caliper Mitutoyo®) (ICHIKAWA *et al.*, 1971; OLIVEIRA, 2019).

4.5.3 Teste antibacteriano em microplaca de 96 poços

O ensaio para verificar a atividade antibacteriana dos filtrados, oriundos de fungos com atividade já registrada no Bloco de Gelose, normalmente, é realizado em meio sólido. O método pode ser difusão em ágar, seja por meio de discos, cilindros de aço inoxidável ou vidro (template) e perfuração em ágar ou em poço (ALVES *et al.*, 2008; BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Porém, realizou-se o protocolo proposto por Oliveira (2019), na qual elas adaptou o ensaio de microdiluição para se obter a Concentração mínima inibitória-CMI, proposta pelo documento M07-A9 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

Ou seja, a análise foi feita em microplacas de 96 poços, com todos os filtrados, obtidos no item 4.4, do fungo selecionado no item 4.5.2. Nesse teste adaptado, não ocorreu a diluição seriada, com o objetivo de se realizar uma seleção inicial dos filtrados com atividade antibacteriana, economizando tempo e material, e só depois ser feita a CMI.

4.5.3.1 Suspensão celular do patógeno

Inicialmente, as mesmas bactérias do item 4.5.1, foram, novamente, cultivadas em caldo Mueller-Hinton, a 37°C e por cerca de 24 horas. Vale ressaltar que esse teste foi feito com os mesmos patógenos utilizados no Bloco de Gelose, e não só com os que foram sensíveis. O objetivo foi verificar se os resultados obtidos no Bloco de gelose foram devido a dificuldade dos possíveis compostos presentes, oriundos dos *Trichodermas*, em se difundir no ágar ou se realmente não havia moléculas capazes de inibir o patógeno em questão (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019).

Em seguida, foram retiradas alíquotas desse cultivo para serem feitas as respectivas padronizações, através das absorbâncias em Espectrofotômetros UV/VIS (Modelo: Biospectro® SP220-Digital), com o comprimento de onda de 600 nm. Realizou-se diluições com o caldo Mueller-Hinton, de acordo com a necessidade, de forma que a absorbância sempre chegasse em um valor compreendido entre 0,08-0,1. Essa faixa era necessária para que o cultivo estivesse com uma turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland e, conseqüentemente, com uma concentração de 1×10^8 UFC/mL.

Após essa turvação ser alcançada, foram efetuadas novas diluições, com o caldo Mueller-Hinton, até que se atingisse a concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL. Dessa forma, ao serem feitas as inoculações de 20 μ L das suspensões nos poços testes, as concentrações dos patógenos seriam de 5×10^4 UFC/poço, a mesma que é indicada pelo CLSI no método da microdiluição.

4.5.3.2 Preparação das Microplacas e realização do ensaio

As microplacas de 96 poços, com fundo chato Kasvi®, tiveram seus poços organizados de acordo com as instruções do leitor de microplaca (Modelo: Bio Rad iMark™), conforme a Figura 6 e a Tabela 5.

Nos poços Branco, adicionou-se apenas o meio de cultura (70 μ L de caldo Mueller-Hinton) e o filtrado a ser testado (50 μ L). Enquanto nos poços testes, foram adicionados 50 μ L de caldo Mueller-Hinton, 50 μ L do filtrado e 20 μ L da suspensão celular bacteriana ($2,5 \times 10^6$ UFC/mL), produzida no item anterior 4.5.3.1, em triplicata. Dessa forma, avaliou-se se os filtrados inibiram o crescimento dos patógenos utilizados.

Assim como, foram separados poços para o controle negativo, usados para verificar se as bactérias estavam crescendo normalmente no meio utilizado, para o controle positivo com o antibiótico Cloranfenicol 30 μ g/mL, e também poços para verificar se a água e o meio de cultura estavam esterilizados.

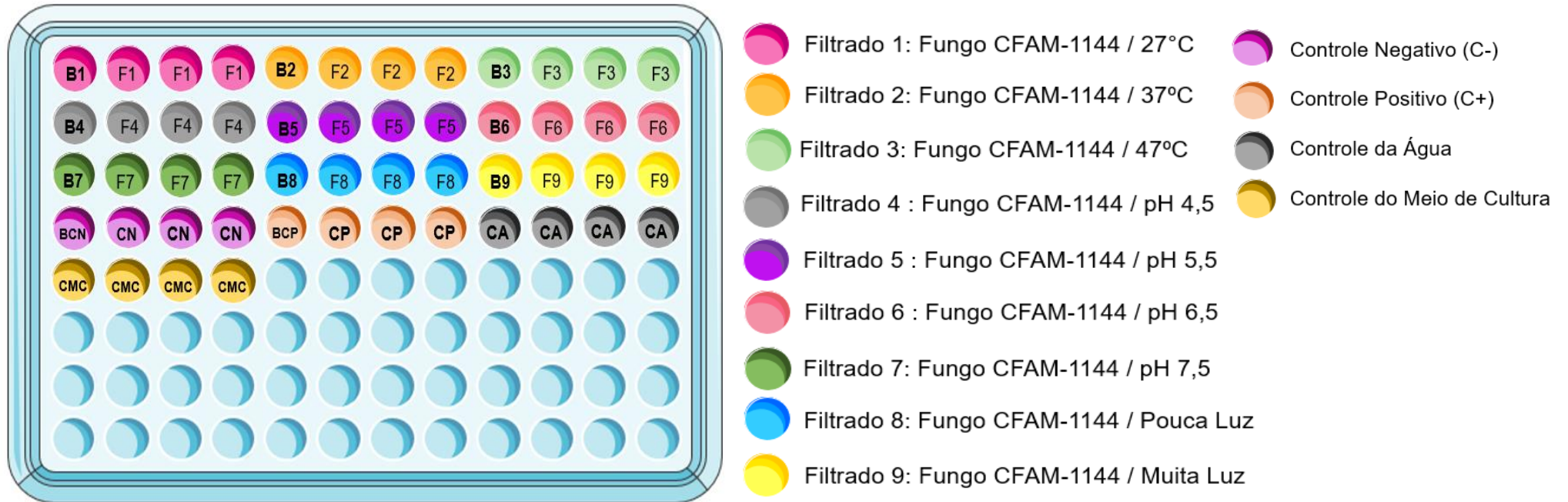
Após o preparo das microplacas, elas foram colocadas em uma estufa incubadora BOD (Modelo: Ethik 411-TD), a 37°C por 24 horas. Posteriormente, verificou-se a absorbância apresentada nos poços, no leitor de microplaca (Modelo: Bio Rad iMark™), utilizando-se o comprimento de onda de 595 nm para saber se houve crescimento bacteriano ou não, comparando-se com o Controle Negativo e Positivo.

Tabela 5-Esquema de Preenchimento dos poços das microplacas da Atividade antibacteriana (Adaptado do Método de Microdiluição)

	Branco Teste (Bx)	Teste (Fx)	Branco Controle Negativo (BC-)	Controle Negativo (C-)	Branco Controle Positivo (BC+)	Controle Positivo (C+)	Controle da Água (CA)	Controle do Meio de Cultura (CMC)
Caldo Mueller-Hinton	70 µL	50 µL	70 µL	50 µL	70 µL	50 µL	-	120 µL
Filtrado	50 µL	50 µL	-	-	-	-	-	-
Patógeno	-	20 µL	-	20 µL	-	20 µL	-	-
Água destilada	-		50 µL	50 µL	-	-	120 µL	-
Antibiótico	-		-	-	50 µL	50 µL	-	-

Fonte: Adaptado de Oliveira (2019).

Figura 10- Figura Esquemática das microplacas de 96 poços utilizadas na determinação da atividade antibacteriana dos filtrados de *Trichoderma spp.* oriundos de diferentes condições de cultivo



Fonte: Adaptado de Oliveira (2019).

4.5.4 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) é dita como a menor concentração de uma substância capaz de impedir o crescimento visual de um microrganismo (CLSI, 2012; OLIVEIRA, 2019).

A determinação dessa concentração aconteceu através do método de microdiluição, utilizando-se as recomendações do CLSI (2012), presentes em um documento chamado de M07-A9, através das adaptações de Oliveira (2019), para serem feitas leituras espectrofotométricas e a confirmação da inibição ou não.

Os filtrados que demonstraram ter os melhores resultados no item 4.5.3 foram os objetos de investigação nesse teste. Novamente, utilizou-se os mesmos patógenos do item 4.5.2 e 4.5.3, para averiguar se as concentrações utilizadas na diluição seriada, do ensaio atual, não gerariam alguma diferença nos resultados, em comparação aos demais testes de atividade antibacteriana.

4.5.4.1 Preparação dos filtrados

Inicialmente, realizou-se a liofilização, pesagem e ressuspensão, com água destilada esterilizada, de cada um dos filtrados selecionados no item 4.5.3, para que ficassem na concentração de 10 mg/ml. Porém, para saber qual seria a concentração mínima inibitória dessas amostras é necessário efetuar uma diluição seriada nas microplacas (Da linha A até a linha G), formando 7 diluições, que nesse caso são 5,0 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,63 mg/mL; 0,31 mg/mL; 0,16 mg/mL e 0,08 mg/mL.

4.5.4.2 Preparação das Microplacas e realização do ensaio

Em duas microplacas de 96 poços, com fundo chato Kasvi[®], foram inseridos 100 µL do Caldo Mueller-Hinton, em todos os poços das colunas utilizadas da linha A até a Linha G. Em seguida, adicionou-se 100 µL dos filtrados em 4 poços da Linha A, com um destinado ao branco e os outros três a triplicata do filtrado em questão, os chamados poços-teste.

Após homogeneizar, realizou-se a diluição seriada, na qual eram transferidos 100 µL dessa mistura dos poços-teste da Linha A para os poços-teste abaixo dele, na linha B, e assim por diante, em todas as colunas necessárias, até a Linha G. Importante destacar que, ao chegar na Linha G, era necessário dispensar os 100 µL

finais para evitar maior concentração nessa linha que nos poços acima, assim como, não colocar na Linha H para não contaminar os controles.

Nos poços testes, foram inseridos 20 µL da suspensão celular do patógeno a ser testado, preparados seguindo o mesmo passo a passo do item 4.5.3.1. Isso fez cada poço ficar com um volume final de 120 µL, constituído de meio de cultura, extrato bruto e patógeno. Foram preparadas duas microplacas para cada patógeno, em virtude da quantidade de filtrados testados (FIGURA 7 E TABELA 6).

Os poços testes e os poços branco da linha H da Microplaca 1, de cada patógeno, eram destinados aos controles negativo, constituído de Caldo Mueller-Hinton + Patógeno, positivo, na qual foi adicionado o Caldo Mueller-Hinton + Patógeno + Antibiótico (Cloranfenicol 30 µg/mL) e o controle do meio de cultura. Enquanto os poços na Linha H, da Microplaca 2, eram destinados apenas ao controle da água utilizada no ensaio como um todo (FIGURA 7 E TABELA 6).

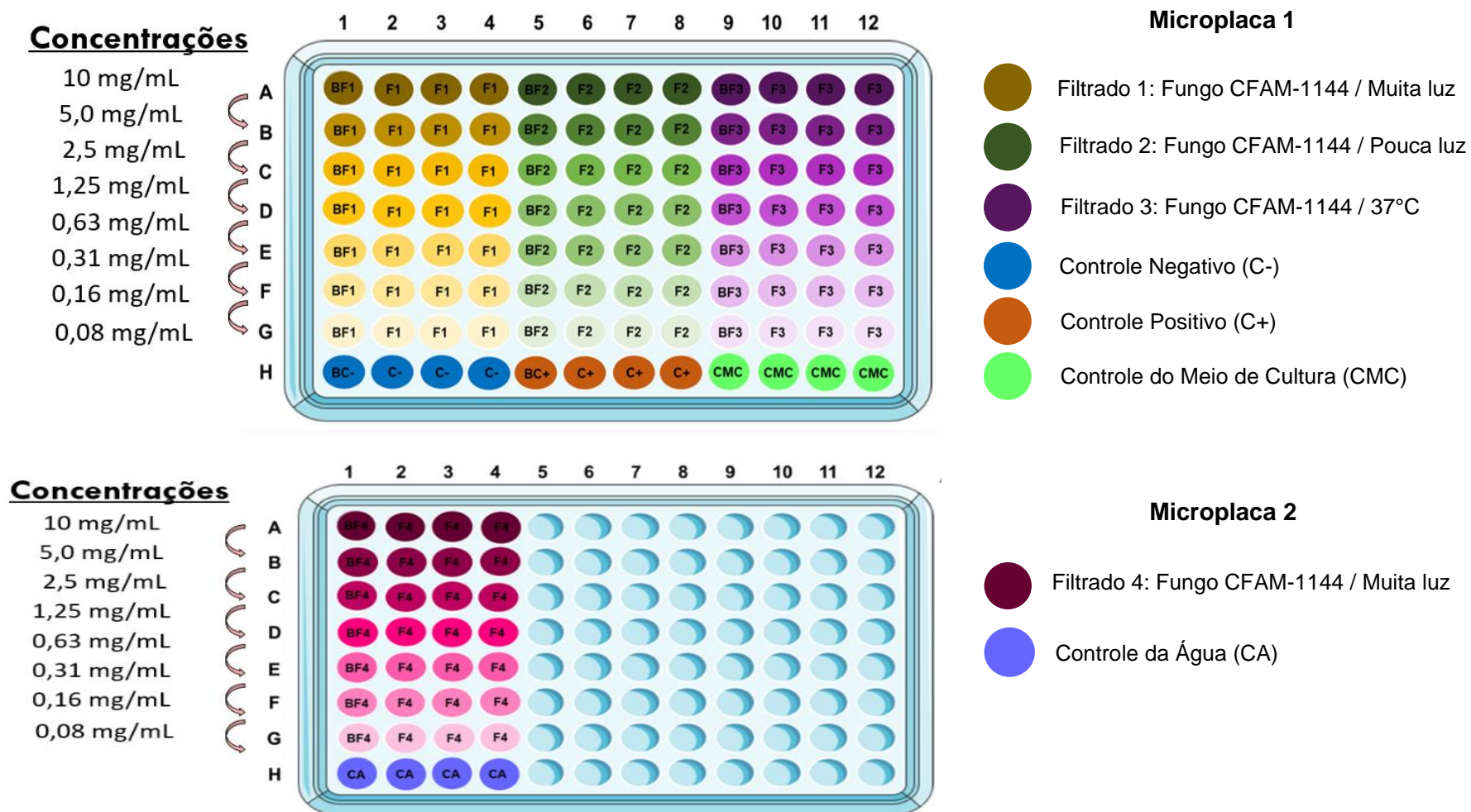
Após todo o processo de preparo das microplacas, elas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em uma estufa incubadora BOD (Modelo: Ethik 411-TD). Posteriormente, foi obtido a absorbância de cada poço no leitor de microplaca (Modelo: Bio Rad iMark™), utilizando-se comprimento de onda de 595 nm. O objetivo era verificar se houve crescimento bacteriano ou não nos poços, demonstrando ou não uma ação antibacteriana de compostos presentes nos filtrados.

Tabela 6-Esquema de Preenchimento dos poços das microplacas para a avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

	Branco Teste (Bx)	Teste (Fx)	Branco Controle Negativo (BC-)	Controle Negativo (C-)	Branco Controle Positivo (BC+)	Controle Positivo (C+)	Controle da Água (CA)	Controle do Meio de Cultura (CMC)
Caldo Mueller-Hinton	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	70 µL	50 µL	-	120 µL
Filtrado	100 µL	100 µL	-	-	-	-	-	-
Patógeno	-	20 µL	-	20 µL	-	20 µL	-	-
Água destilada	-	-	-	-	-	-	120 µL	-
Antibiótico	-	-	-	-	50 µL	50 µL	-	-
Total após a Diluição Seriada	100 µL	120 µL	100 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL

Fonte: Adaptado de Oliveira (2019).

Figura 11-Figura Esquemática das microplacas de 96 poços utilizadas na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 4 filtrados selecionados do *Trichoderma virens* (CFAM-1144)



Fonte: Adaptado de Oliveira (2019).

4.6 Análises Estatísticas

Todos os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística descritiva (Média \pm Desvio Padrão) e Análise de Variância (ANOVA). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da produção de biomassa

5.1.1 Influência da temperatura na produção de biomassa de *Trichoderma* spp.

Os resultados obtidos na produção da biomassa das linhagens *T. harzianum* CFAM 1210, *T. virens* CFAM 1144, *Trichoderma* sp. CFAM 1162, *Trichoderma* sp. CFAM 0792 e *Trichoderma* sp. CFAM 1163 cultivadas nas temperaturas de 27°C, 37°C e 47°C estão presentes na Tabela 7.

A temperatura de 27°C foi a que mais estimulou a formação de biomassa entre as cinco cepas avaliadas, com a média do peso da massa seca de 0,66 g/100 ml. A temperatura de 47°C foi a que menos estimulou a produção de biomassa, uma vez que a média do peso da massa seca foi de 0,20 g/100 ml entre as linhagens avaliadas.

Ao comparar a média de massa seca entre as cinco cepas de *Trichoderma*, após o cultivo com as 3 temperaturas, observou-se que o *Trichoderma* sp. CFAM 1163 apresentou o menor crescimento com 0,29 g/100 ml. Enquanto o *T. virens* CFAM 1144, *Trichoderma* sp. CFAM 1162 e *Trichoderma* sp. CFAM 0792 foram os que mais cresceram, com médias de 0,50, 0,49 e 0,45g/100ml respectivamente, mas sem diferença estatística significativa entre si.

O *Trichoderma* sp. CFAM 0792 foi o que mais formou massa seca, quando cultivado em 27°C e 37°C, com médias de massa de 0,77g/100ml e 0,76 g/100ml, respectivamente. Por outro lado, o *Trichoderma* sp. CFAM 1163 foi o fungo que produziu menos biomassa a 27°C, com o valor de 0,53g/100ml e o *T. harzianum* CFAM 1210 também produziu menos, só que em 37°C, com média de 0,37g/100ml. A temperatura de 47°C de fato não apresentou influência na formação de biomassa das cinco linhagens avaliadas, pois as médias não apresentaram diferença estatística entre si.

Tabela 7 - Efeito das diferentes temperaturas na produção de biomassa (Peso da Massa Seca) de fungos do gênero *Trichoderma* spp.

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Fungos					Médias
	<i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210	<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0792	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163	
	-----Médias (g/100mL) ± DP-----					
27°C	0,63 ± 0,10 ^{c,12}	0,67 ± 0,05 ^{b,12}	0,68 ± 0,05 ^{b,12}	0,77 ± 0,01 ^{b,2}	0,53 ± 0,04 ^{b,1}	0,66 ± 0,09 ^c
37°C	0,37 ± 0,06 ^{b,1}	0,65 ± 0,18 ^{b,12}	0,58 ± 0,08 ^{b,12}	0,76 ± 0,04 ^{b,2}	0,46 ± 0,11 ^{b,12}	0,56 ± 0,15 ^b
47°C	0,20 ± 0,06 ^a	0,18 ± 0,12 ^a	0,21 ± 0,02 ^a	0,24 ± 0,11 ^a	0,17 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,03 ^a
Médias	0,40 ± 0,22 ¹²	0,50 ± 0,28 ²	0,49 ± 0,25 ²	0,45 ± 0,31 ²	0,29 ± 0,19 ¹	

Fonte: A Autora.

Nota: ^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os fungos) (P<0,05).

Esse resultado está dentro do que já é conhecido na literatura, em que a faixa ótima de temperatura para crescimento celular varia entre 25°C a 30°C. São poucas as espécies de *Trichoderma* que crescem e esporulam até 40 °C e até o momento, não há registros de que alguma delas cresçam bem acima desse limite(GHAZANFAR; RAZA; RAZA, 2018).

Ghazanfar, Raza e Raza (2018) avaliaram a produção de biomassa de quatro espécies de *Trichoderma*: *T. asperellum* TH, *T. harzianum* HM, *T. harzianum* HK e *T. harzianum* HC, após serem cultivados nas temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C.

Dentre os resultados obtidos, houve maior crescimento em 25°C, com exceção do *T. asperellum* TH que não teve diferença com a média de 30°C. Assim como, menor produção de células em todos os 4 microrganismos, quando avaliados em 40°C, corroborando com o atual estudo e com o que consta na literatura (GHAZANFAR; RAZA; RAZA, 2018).

Diante dessas informações, é possível perceber que se o propósito do estudo é obter maior quantidade de biomassa, o ideal é que se cultive fungos do gênero *Trichoderma* na faixa de 25°C a 30°C. Porém, é sempre importante investigar qual temperatura mais influência, de acordo com a espécie a ser estudada, no crescimento celular, com o intuito de otimizar ainda mais o processo.

5.1.2 Influência do pH na produção de biomassa de *Trichoderma* spp.

Na Tabela 8, é possível verificar o comportamento das cinco cepas, diante dos diferentes pHs a qual foram submetidos no cultivo. O pH 5,5 foi o que mais influenciou de forma positiva no crescimento celular, com uma média de 0,71 g/100ml entre todos os 5 fungos. Em contrapartida, o pH 7,5 foi o que mais prejudicou o crescimento, com 0,59 g/100ml em média.

Os *Trichoderma* spp., normalmente, crescem e esporulam em uma faixa de pH que vai de 2,5 até 7,5. Apresentam uma faixa ótima que vai do pH 4 até o pH 7, no entanto o pH 6,5 é descrito como o mais favorável para formação de biomassa (ABREU; PFENNING, 2019; GHAZANFAR; RAZA; RAZA, 2018; LISBOA, 2017; MASCARIN *et al.*, 2019).

Tabela 8- Efeito dos diferentes pHs na produção de biomassa (Peso da Massa Seca) de fungos do gênero *Trichoderma* spp.

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Fungos					Médias
	<i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210	<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0792	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163	
	-----Médias (g/100mL) ± DP-----					
pH 4,5	0,95 ± 0,05 ^{c,3}	0,77 ± 0,03 ^{a,23}	0,62 ± 0,03 ^{a,12}	0,72 ± 0,04 ^{a,23}	0,39 ± 0,21 ^{a,1}	0,69 ± 0,20 ^{ab}
pH 5,5	0,78 ± 0,08 ^{b,23}	0,86 ± 0,05 ^{a,3}	0,58 ± 0,02 ^{a,1}	0,68 ± 0,01 ^{a,12}	0,63 ± 0,07 ^{a,2}	0,71 ± 0,11 ^b
pH 6,5	0,73 ± 0,03 ^{b,3}	0,75 ± 0,04 ^{a,3}	0,58 ± 0,02 ^{a,12}	0,69 ± 0,01 ^{a,2}	0,51 ± 0,02 ^{a,1}	0,65 ± 0,10 ^{ab}
pH 7,5	0,45 ± 0,01 ^{a,1}	0,71 ± 0,07 ^{a,3}	0,61 ± 0,05 ^{a,2}	0,68 ± 0,02 ^{a,3}	0,48 ± 0,03 ^{a,1}	0,59 ± 0,11 ^a
Médias	0,73 ± 0,21 ³⁴	0,77 ± 0,06 ⁴	0,60 ± 0,27 ²	0,69 ± 0,31 ³	0,50 ± 0,10 ¹	

Fonte: A Autora.

Nota: ^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os fungos) (P<0,05).

Os experimentos realizados por Ghazanfar, Raza e Raza (2018) demonstraram um melhor crescimento, das espécies de *Trichoderma* testadas, em ambiente ácido em comparação ao ambiente alcalino. Todas geraram maior biomassa na faixa de pH 5 até pH 7. Em contrapartida, reduziram, de forma significativa, a partir do pH 8,0 e abaixo do pH 3,0.

Esses resultados corroboram com o atual estudo, cujo maior estímulo a formação de biomassa foi o pH 5,5 e o menor pH 7,5. Isto mostrou que essa faixa de pH 5 até pH 7 é a ideal para o maior crescimento celular.

O pH ácido é descrito como o fator chave no crescimento celular de todas as espécies de *Trichoderma*, pois na natureza, além deles crescerem melhor em solo ácido, também modificam a rizosfera ao acidificar o solo, quando necessário, pois é uma condição desfavorável para o crescimento de fitopatógenos (GHAZANFAR; RAZA; RAZA, 2018).

Ao comparar os cinco fungos, diante de todos os pHs testados, o *Trichoderma virens* CFAM 1144 foi o que mais gerou massa seca, com 0,77g/100ml. Em contrapartida, o *Trichoderma sp.* CFAM 1163 foi o que menos produziu com 0,50 g/100ml.

No pH 4,5, o *Trichoderma harzianum* CFAM 1210 foi o que mais se desenvolveu, assim como no pH 6,5, com média de 0,95 g/100ml e 0,73 g/100ml respectivamente. Essa mesma espécie só apresentou menor produção em pH 7,5 com 0,45 g/100ml.

Da mesma forma que Ghazanfar, Raza e Raza (2018) apresentaram, pois verificaram que a produção máxima de biomassa, de uma linhagem de *T. harzianum*, foi na faixa de pH entre 5 e 7, e de temperatura entre 25° e 30 °C.

Neste estudo, entre os microrganismos analisados, o *T. virens* CFAM 1144 foi o mais estimulado nos pHs 5,5, 6,5 e 7,5, com valores de média de 0,86, 0,75 e 0,71 g/100ml, respectivamente.

O *Trichoderma sp.* CFAM 1163 foi o que menos cresceu no pH 4,5, no pH 6,5 e no pH 7,5, com médias de 0,39, 0,51 e 0,48 g/100ml de forma respectiva. Esse comportamento influenciou na posição de ambos, como os fungo que mais e menos gerou massa seca em comparação aos demais, citada anteriormente.

Outros resultados que se destacaram foi o *Trichoderma* sp. CFAM 0792 que foi um dos que mais cresceram no pH 7,5, com média de 0,68g/100mL, junto com o CFAM 1144 e o *Trichoderma* sp. CFAM 1162 que foi o que menos cresceu no pH 5,5.

Diversos pesquisadores relatam que temperatura, pH e luminosidade são os principais fatores ambientais utilizados para aumentar a produção de biomassa, nesse gênero, e que influenciam na síntese de determinados metabólitos (ABREU; PFENNING, 2019; FRANCISCO, 2016; GHAZANFAR; RAZA; RAZA, 2018; LISBOA, 2017; MASCARIN *et al.*, 2019).

5.1.3 Influência da luminosidade na produção de biomassa de *Trichoderma* spp.

Os efeitos na formação de biomassa dos diferentes níveis de exposição a luz, a qual os cinco fungos foram submetidos no período de cultivo, estão registradas na Tabela 9. Dentre os três níveis, o Muita Luz foi o que levou à maior média de biomassa seca com 0,74g/100ml.

Ao se avaliar a média de massa seca entre as 3 condições de exposição a luz, o *Trichoderma* sp. CFAM 0792 foi o que produziu mais com 0,80 g/100ml, mas ao se verificar por condição outros resultados se destacam. Porém, na condição de muita luz, os maiores produtores foram CFAM 0792, com 0,89g/100ml, o *T. virens* CFAM 1144, com 0,82 g/100ml, e o *Trichoderma* sp. CFAM 1162, com 0,89g/100ml.

Já os que menos geraram massa seca nessa mesma condição foi o *T.harzianum* CFAM 1210 e o *Trichoderma* sp. CFAM 1163, com 0,55 e 0,57g/100ml. Esse cenário se manteve na condição de pouca luz, porém com diferentes valores. Em contrapartida, na ausência de luz somente o CFAM 0792 se destacou com a maior formação de biomassa e o CFAM 1163 como o pior, com valores de média de 0,77 e 0,53 g/100ml.

Tabela 9-Efeito de diferentes níveis de exposição a luz na produção de biomassa (Peso da Massa Seca) de fungos do gênero *Trichoderma* spp.

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Fungos					Médias
	<i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210	<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0792	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163	
	-----Médias (g/100mL) ± DP-----					
*Muita luz	0,55 ± 0,03 ^{a,1}	0,82 ± 0,13 ^{a,2}	0,89 ± 0,12 ^{b,2}	0,89 ± 0,09 ^{a,2}	0,57 ± 0,05 ^{a,1}	0,74 ± 0,17 ^c
**Pouca luz	0,55 ± 0,02 ^{a,1}	0,72 ± 0,05 ^{a,2}	0,69 ± 0,03 ^{a,2}	0,73 ± 0,02 ^{a,2}	0,47 ± 0,01 ^{b,1}	0,63 ± 0,11 ^a
Ausência de luz	0,63 ± 0,10 ^{a,12}	0,67 ± 0,05 ^{a,12}	0,68 ± 0,05 ^{a,12}	0,77 ± 0,01 ^{a,2}	0,53 ± 0,04 ^{a,1}	0,66 ± 0,09 ^a
Médias	0,58 ± 0,05 ²	0,74 ± 0,08 ¹²	0,75 ± 0,12 ¹²	0,80 ± 0,08 ¹	0,39 ± 0,05 ²	

Fonte: A Autora.

Nota: ^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os fungos) (P<0,05).

São poucos os trabalhos que demonstram essa relação da biomassa com a exposição a luz entre os *Trichodermas*, mas sabe-se da forte influência que a luz exerce sobre os conídios submersos (MASCARIN *et al.*, 2019).

Esse talvez seja o motivo da maior produção de massa seca com muita luz. Pois, ao se realizar a fermentação líquida, o fungo forma micélio e conídios submersos no meio, o que, normalmente constitui a sua biomassa. A depender do quanto as condições, nutricional e ambiental local, sejam desfavoráveis para os *Trichodermas*, ele também forma microescleródios e clamidósporos para constituírem esse grupo (MASCARIN *et al.*, 2019).

Esses conídios, por sua vez, necessitam de luz para o início da conidiogênese, ou seja, para o seu surgimento, na maioria das espécies. A etapa inicial da percepção de luz pelos fotorreceptores depende do nível metabólico das células fúngicas (MASCARIN *et al.*, 2019).

Quanto mais jovens e metabolicamente ativas mais elas são sensíveis a luz e, após serem estimuladas, ocorrem alterações fisiológicas e morfológicas com consequente formação de conídios. Então quanto mais luz, mais as células jovens de *Trichoderma* são induzidas a formar conídios, o que gera uma maior biomassa seca (CARRERAS-VILLASEÑOR; SÁNCHEZ-ARREGUÍN; HERREA-ESTRELLA, 2012; MASCARIN *et al.*, 2019).

No entanto, a influência da luz não se limita a fotoconidiação, também impacta diversas vias, como o crescimento vegetativo, o metabolismo de carbono, resposta ao estresse oxidativo e a biossíntese de peptabóis, através de maquinaria que funciona como regulador. São vários os fotorreceptores envolvidos nesse processo como o BLR1, o BLR2 e o ENVOY, assim como cascatas de sinalização, como aquelas envolvendo as proteínas G heterotriméricas (CARRERAS-VILLASEÑOR; SÁNCHEZ-ARREGUÍN; HERREA-ESTRELLA, 2012; SCHMOLL; ESQUIVEL-NARANJO; HERRERA-ESTRELLA, 2010).

Dessa forma, de acordo com a expressão gênica dessa maquinaria, cada espécie se desenvolve de uma forma diante do estímulo da luz. Com isso, algumas linhagens de *Trichodermas*, usados nesse estudo, originaram mais e outros menos diante do nível de exposição a luz a qual foram submetidos durante o período de cultivo.

5.2 Avaliação da produção de colorantes

5.2.1 Influência da temperatura na produção de colorantes por *Trichoderma* spp.

Os cinco *Trichodermas* também foram avaliados quanto a sua produção de colorantes, com o objetivo de verificar se havia uma maior ou menor formação diante de três diferentes temperaturas. Os resultados oriundos dessa análise estão como Unidades de Absorbância (UA) na Tabela 10.

Dentre as temperaturas selecionadas para a avaliação, a de 27°C foi a que mais estimulou a formação de colorantes, por todos os fungos, com média de 4,48 UA. Contudo, a temperatura de 47°C teve uma influência quase nula nessa formação, com média de 0,12 UA.

A produção de metabólitos coloridos por *Trichoderma* spp. é pouco estudada, mas a otimização do meio é um passo muito importante para maximizar o rendimento desses produtos fermentativos. Devido a isso, a necessidade de testar diferentes condições de cultivo é imprescindível (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Da mesma forma que na formação da biomassa, os fatores físico-químicos, como pH, temperatura e luminosidade influenciam, diretamente, na produção de colorante, assim como o tipo e a concentração tanto de nutrientes como de micronutrientes (OGBONNA, 2016).

A temperatura é um fator importante para o processo de formação de colorantes porque afeta a fluidez da membrana e, como consequência, a absorção de nutrientes e a excreção de produtos pelos fungos. Isso acaba por influenciar tanto no crescimento como na geração de metabólitos (OGBONNA, 2016; SANTOS, 2018).

Esse comportamento foi o mesmo do item 5.1 e mostra que a temperatura de 27°C é excelente, para os fungos testados, tanto se o objetivo for a geração de biomassa, quanto a de colorante (OGBONNA, 2016).

Enquanto a de 47°C não é indicada para ambas as situações, até promoveu uma supressão total de secreção de colorantes, em muitos dos cultivos. Essa comparação é importante porque o pH ideal para estimular a formação de pigmento pode não ser o mesmo para o crescimento celular (OGBONNA, 2016)

Dentre os fungos analisados diante dessas temperaturas, o *Trichoderma* sp. CFAM 1163 e o *Trichoderma virens* CFAM 1144 foram o que mais secretaram colorante para o meio, com médias de 3,11 e 3,00 UA respectivamente.

Tabela 10-Efeito de diferentes temperaturas na produção de colorantes de fungos do gênero *Trichoderma* spp. expressos em Unidade de Absorbância (400nm)

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Fungos					Médias
	<i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210	<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0792	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163	
	-----Médias (Unidades de Absorbância) ± DP-----					
27°C	4,58 ± 0,39 ^{b,2}	4,15 ± 0,13 ^{b,2}	4,29 ± 0,54 ^{b,2}	2,10 ± 0,59 ^{b,1}	7,30 ± 1,07 ^{b,3}	4,48 ± 1,07 ^c
37°C	0,74 ± 0,15 ^{a,1}	4,81 ± 0,65 ^{b,4}	3,12 ± 1,70 ^{b,3}	1,98 ± 0,30 ^{b,2}	1,90 ± 1,14 ^{a,2}	2,51 ± 1,54 ^b
47°C	0,07 ± 0,06 ^{a,12}	0,03 ± 0,02 ^{a,1}	0,04 ± 0,05 ^{a,1}	0,34 ± 0,02 ^{a,2}	0,13 ± 0,02 ^{a,12}	0,12 ± 0,12 ^a
Médias	1,80 ± 2,18 ¹	3,00 ± 2,59 ²³	2,48 ± 2,19 ²	1,47 ± 0,98 ¹	3,11 ± 3,74 ³	

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3,4} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre as bactérias) (P<0,05).

Em contrapartida, o *Trichoderma* sp. CFAM 0792 e *T. harzianum* CFAM 1210 foram os que menos secretaram, com valores em média de 1,47 e 1,80 UA. Ao se verificar a atuação desses mesmos fungos por temperatura, em 27°C, é possível perceber que o *Trichoderma* sp. CFAM 1163 foi o que mais gerou colorante, com 7,30 UA, e o *Trichoderma* sp. 0792, também nesse caso, foi o pior com 2,10 UA.

Em 37°C, o quadro se modificou, o que mais produziu foi o *T. virens*, com 4,81 UA, e o que menos produziu colorante foi, novamente, o *T. harzianum* CFAM 1210 com 0,74 UA. Contudo em 47°C, o que melhor apresentou secreção foi o *Trichoderma* sp. CFAM 0792, mas ainda muito baixo em comparação com os resultados nas demais temperaturas, com média de 0,34 UA.

5.2.2 Influência do pH na produção de colorantes por *Trichoderma* spp.

Outra avaliação realizada quanto a secreção de colorantes, foi diante de quatro diferentes pHs. Os resultados obtidos estão na Tabela 11. Nessa categoria de tratamento, os pHs 6,5 e 7,5 foram os que mais estimularam a geração de colorantes, com médias de 5,21 e 4,93 UA respectivamente. E o que menos estimulou foi o pH 4,5 com média de 2,20 UA. Diferente do cenário da geração de biomassa, que teve como melhor o pH 5,5 e o pior o pH 7,5.

Entre os microrganismos, *Trichoderma* sp. CFAM 1163 foi, sem dúvidas, o maior produtor de colorante em todos os 4 pHs utilizados, tanto ao se comparar a média geral dos 5 fungos, como também por pH, ele sempre ocupa essa posição.

Ao contrário do pior produtor, que varia de acordo com a forma como se analisa. O *T. harzianum* CFAM 1210 foi o que menos gerou esse tipo de metabólito, tanto na média geral com 2,44 UA, quando nos pHs 4,5 e 7,5 com 1,00 e 0,21 UA respectivamente. Os *Trichoderma* sp. CFAM 1162 e o CFAM 0792 foram os que menos formaram colorante no pH 5,5, com média de 1,30 UA, e no pH 6,5, com média de 2,72 UA, respectivamente.

Porém, o CFAM 0792 também ocupou essa mesma posição na média geral, com 2,70 UA. Mais uma vez o cenário foi muito diferente do que ocorreu com a produção de biomassa, o que mostra a necessidade de se verificar qual pH mais estimula os microrganismos a serem utilizados, se o objetivo for a maior produção de colorante.

Tabela 11-Efeito de diferentes pHs na produção de colorantes de fungos do gênero *Trichoderma* spp. expressos em Unidade de Absorbância (400nm)

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Fungos					Médias
	<i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210	<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0792	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163	
	-----Médias (Unidades de Absorbância) ± DP-----					
pH 4,5	1,00 ± 0,02 ^{a,1}	2,02 ± 0,19 ^{a,1}	1,60 ± 0,15 ^{a,1}	1,94 ± 0,62 ^{a,1}	4,45 ± 1,90 ^{a,2}	2,20 ± 1,32 ^a
pH 5,5	4,86 ± 3,30 ^{b,12}	3,08 ± 0,25 ^{b,1}	1,30 ± 0,19 ^{a,1}	2,19 ± 0,67 ^{a,1}	8,93 ± 0,19 ^{b,2}	4,07 ± 3,02 ^b
pH 6,5	6,13 ± 1,72 ^{b,23}	4,49 ± 0,39 ^{c,12}	4,14 ± 1,16 ^{ab,12}	2,72 ± 0,34 ^{a,1}	8,58 ± 0,46 ^{b,3}	5,21 ± 2,24 ^c
pH 7,5	0,21 ± 0,23 ^{a,1}	4,85 ± 0,08 ^{c,23}	6,67 ± 0,82 ^{b,3}	3,43 ± 0,16 ^{a,2}	9,48 ± 1,27 ^{b,4}	4,93 ± 3,47 ^c
Médias	2,44 ± 2,85 ¹	3,61 ± 1,30 ¹	3,43 ± 2,51 ¹	2,70 ± 0,66 ¹	7,86 ± 2,30 ²	

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c}Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3,4} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre as bactérias) (P<0,05).

Os *Trichodermas* são fungos que secretam pigmentos para o meio extracelular. Utilizar bioprocessos, em meio submerso, é mais interessante para essa classe de pigmento. Essa escolha pode facilitar a separação do colorante do resto de seus metabólitos e biomassa, além de exigir especial atenção ao pH e a agitação porque são os fatores que mais influenciam nos resultados (SANTOS,2018).

O pH pode impactar muitos aspectos da produção, como na absorção, na utilização de nutrientes e no próprio metabolismo celular do organismo fúngico. O seu efeito vai depender da espécie e do tipo de colorante produzido, e, inclusive, pode afetar a cor. A faixa de pH ácida é a que mais estimula a formação desses metabólitos, salvo exceções como no caso do *Penicillium sp.*, na qual em pH 9,0 gera não só mais pigmento como mais biomassa (OGBONNA, 2016).

Rao, Xiao, Li (2017) relatam sobre a necessidade dos pigmentos de origem microbiana não só serem produzidos em determinadas condições, mas também serem estáveis em pH e em temperaturas extremas, de forma a atender aos padrões industriais. Muitos colorantes fúngicos são estáveis em uma ampla faixa de pH.

5.2.3 Influência da luminosidade na produção de colorantes por *Trichoderma spp.*

Na Tabela 12 consta os resultados da produção de colorantes entre os 5 fungos, quando cultivados em 3 diferentes níveis de exposição a luz.

Dentre esses níveis, o Muita Luz foi o que mais estimulou essa produção com média de 5,07 UA, da mesma forma que na formação de biomassa. Além disso, o *Trichoderma sp.* CFAM 1163 foi o que ocupou a posição de maior produtor, frente a essas condições de cultivo, na média geral com 71,6 UA.

Entretanto, também foi o mais estimulado em cada uma das condições, com médias de 8,58 UA em Muita Luz, 5,60 UA em Pouca Luz e 7,30 em ausência de luz. Ao mesmo tempo que o *Trichoderma sp.* CFAM 0792 foi o que menos produziu tanto na média geral com 1,28 UA, como em cada um dos tratamentos. No caso com muita luz foi com média de 1,71 UA e na Ausência de luz com 2,10.

Tabela 12-Efeito dos níveis de exposição a luz na produção de colorantes de fungos do gênero *Trichoderma* spp. expressos em Unidade de Absorbância (400nm)

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Fungos					Médias
	<i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210	<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0792	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163	
	-----Médias (Unidades de Absorbância) ± DP-----					
Muita luz*	3,04 ± 1,14 ^{a,2}	7,76 ± 0,50 ^{b,3}	4,26 ± 1,70 ^{a,2}	1,71 ± 0,27 ^{a,1}	8,58 ± 0,77 ^{b,4}	5,07 ± 2,98 ^b
Pouca luz**	1,07 ± 0,24 ^{a,1}	4,69 ± 0,04 ^{a,23}	4,03 ± 0,89 ^{a,2}	1,31 ± 0,19 ^{a,1}	5,60 ± 0,37 ^{a,3}	3,34 ± 2,04 ^a
Ausência de luz	4,58 ± 0,39 ^{a,2}	4,15 ± 0,13 ^{a,2}	4,29 ± 0,54 ^{a,2}	2,10 ± 0,59 ^{a,1}	7,30 ± 1,07 ^{ab,3}	4,48 ± 1,85 ^{ab}
Médias	2,90 ± 1,76 ²	5,53 ± 1,95 ⁴	4,19 ± 0,14 ³	1,28 ± 0,40 ¹	7,16 ± 1,49 ⁵	

Fonte: A Autora (2020).

Nota: * Muita luz (3,42 PAR (7,6 watts.m⁻²)).**Pouca luz (2,12 PAR (4,71 watts.m⁻²)). ^{a,b} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3,4} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre as bactérias) (P<0,05).

Porém, no tratamento com pouca luz, ele não foi o único, apresentou a menor produção junto com o *T. harzianum* CFAM 1210, com médias de 1,31 e 1,07UA, respectivamente. Mais uma vez, uma situação oposta ao que ocorreu na análise de biomassa, quando ele foi o que mais gerou massa seca em todos os níveis de exposição a luz.

Cenário totalmente oposto ao da geração de biomassa, na qual ele foi o que menos cresceu em todos os níveis de exposição a luz, o que eleva a necessidade de uma investigação cautelosa quanto às condições de cultivo a serem utilizadas para o máximo rendimento.

Os fungos respondem à luz, seja de forma positiva ou negativa, tanto no seu crescimento celular como na formação de metabólitos. Cada gênero, espécie e cepa se comporta de uma forma diante do nível de luminosidade existente no ambiente, às vezes há uma inibição da produção de colorante com a presença da luz (OGBONNA, 2016).

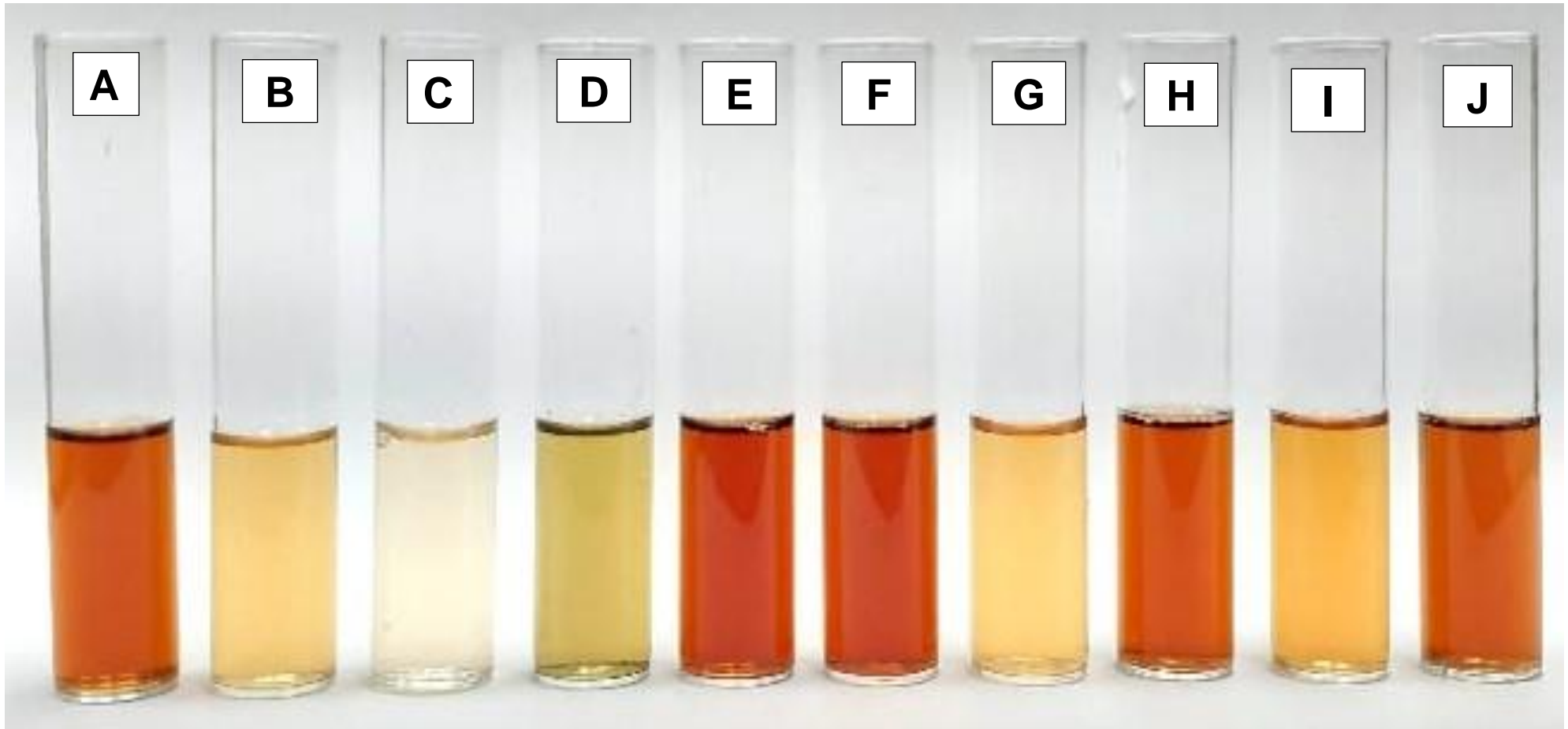
Outras vezes o fungo até produz com a sua presença, mas aumenta essa formação com a sua ausência. O efeito da luz, tanto no crescimento quanto na produção dos colorantes, pode depender também do comprimento de onda da luz, assim como depende do colorante alvo (OGBONNA, 2016).

De acordo com as condições da cultura, diferentes cores podem ser produzidas pelos fungos (OGBONNA, 2016). No atual estudo, o *T. harzianum* CFAM 1210 e o *Trichoderma* sp. CFAM 1163 produziram colorantes castanho-avermelhadas, o *T. virens* CFAM 1144 e o *Trichoderma* sp. CFAM 1162 geraram um amarelo ouro. Já o *Trichoderma* sp. CFAM 0792 produziu um metabólito verde musgo, como podem ser vistos nas Figuras 12 a 16.

Dentre todas as mudanças na cor, perceptíveis a olho nu, a maior mudança ocorreu com *T. harzianum* CFAM 1210 porque ao ser cultivado no pH 4,5, mudou sua coloração castanho-avermelhado para um tom esverdeado. Também é possível ver uma variação forte de cores nos diferentes níveis de exposição a luz e nas temperaturas testadas (FIGURA 12).

Essa mudança nas temperaturas é perceptível no caso do *T. virens* CFAM 1144, *Trichoderma* sp. CFAM 1163 e no *Trichoderma* sp. CFAM 0792, com o 47°C sempre com ausência de coloração, mesmo que o espectrofotômetro ainda registre alguma absorção (TABELA 10 e FIGURA 12, 15 e 16).

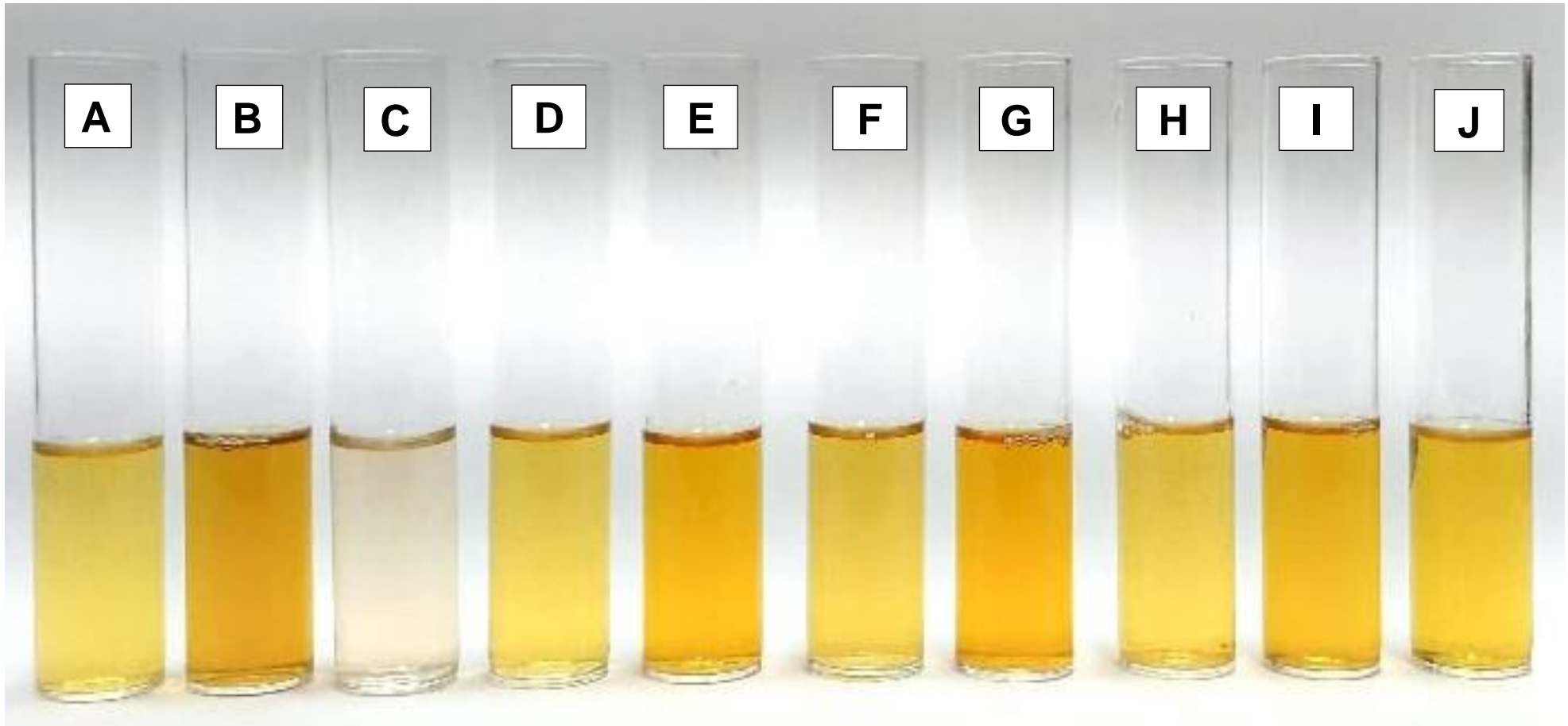
Figura 12-Filtrados (Extratos Brutos) do fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1210)



Fonte: A Autora (2020).

Nota: A= 27°C; B= 37°C; C=47°C; D= pH 4,5; E= pH 5,5; F= pH 6,5; G= pH 7,5; H= Ausência de luz; I= Pouca luz; J= Muita luz

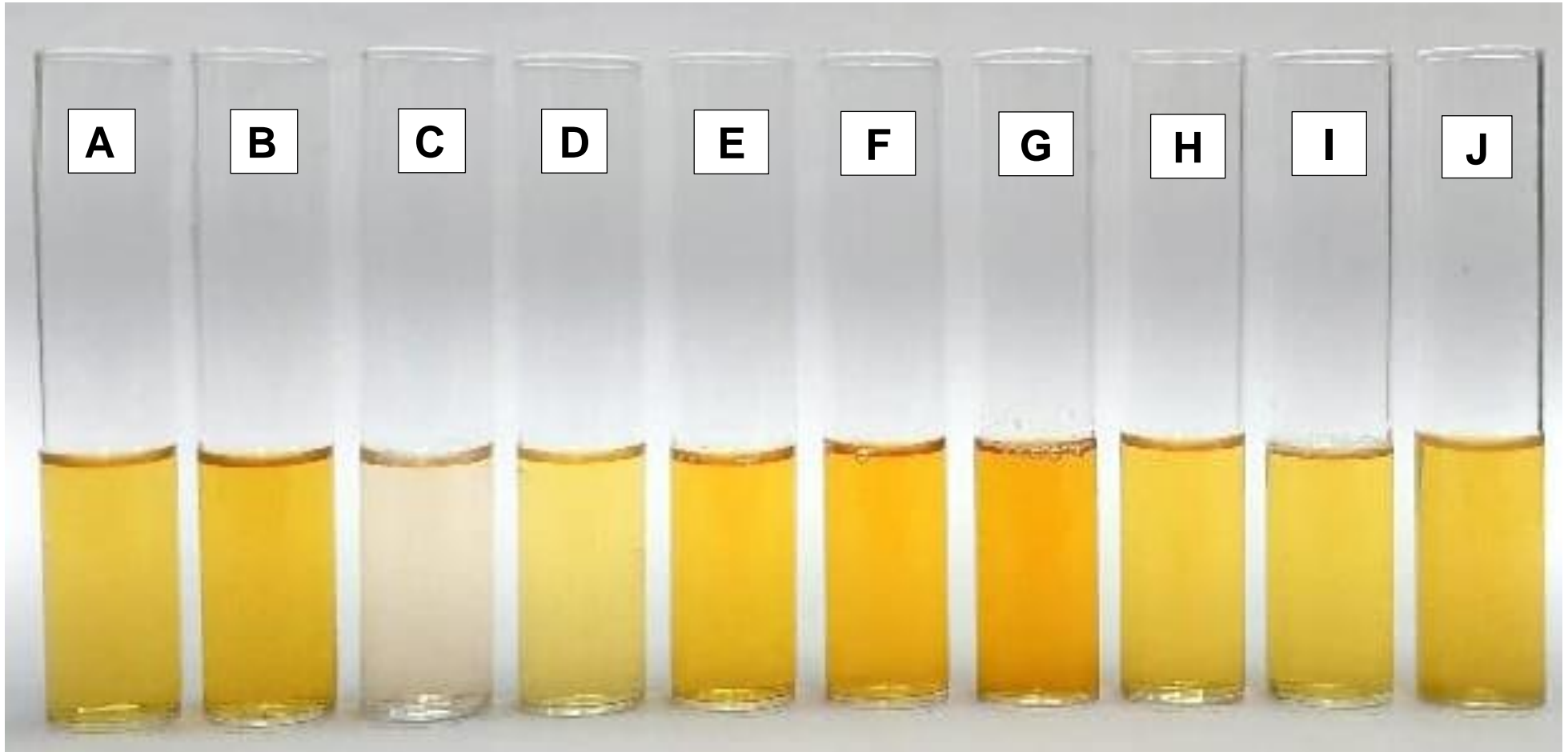
Figura 13-Filtrados (Extratos Brutos) do fungo *Trichoderma virens* (CFAM 1144)



Fonte: A Autora (2020).

Nota: A= 27°C; B= 37°C; C=47°C; D= pH 4,5; E= pH 5,5; F= pH 6,5; G= pH 7,5; H= Ausência de luz; I= Pouca luz; J= Muita luz

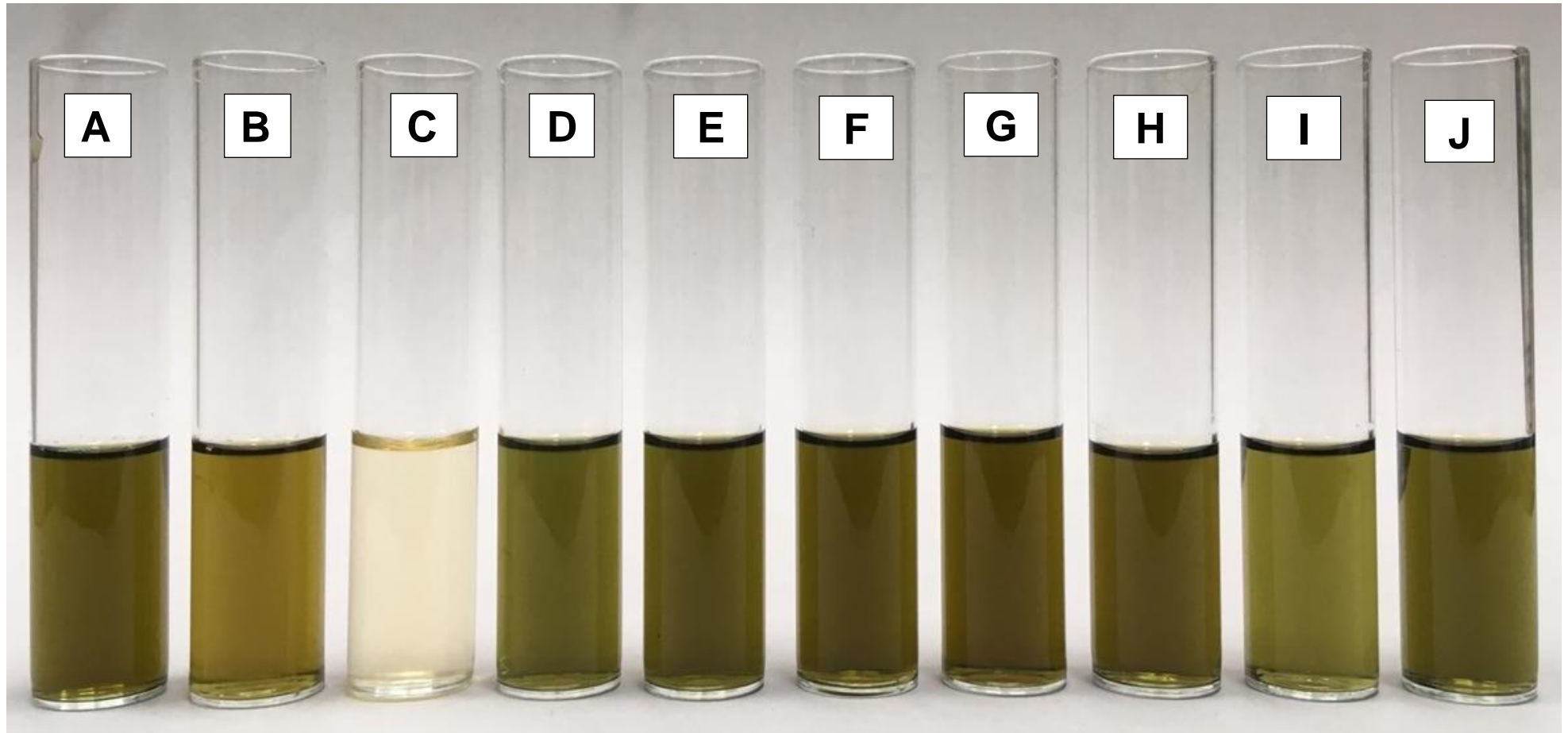
Figura 14-Filtrados (Extratos Brutos) do fungo *Trichoderma sp.* (CFAM 1162)



Fonte: A Autora (2020).

Nota: A= 27°C; B= 37°C; C=47°C; D= pH 4,5; E= pH 5,5; F= pH 6,5; G= pH 7,5; H= Ausência de luz; I= Pouca luz; J= Muita luz

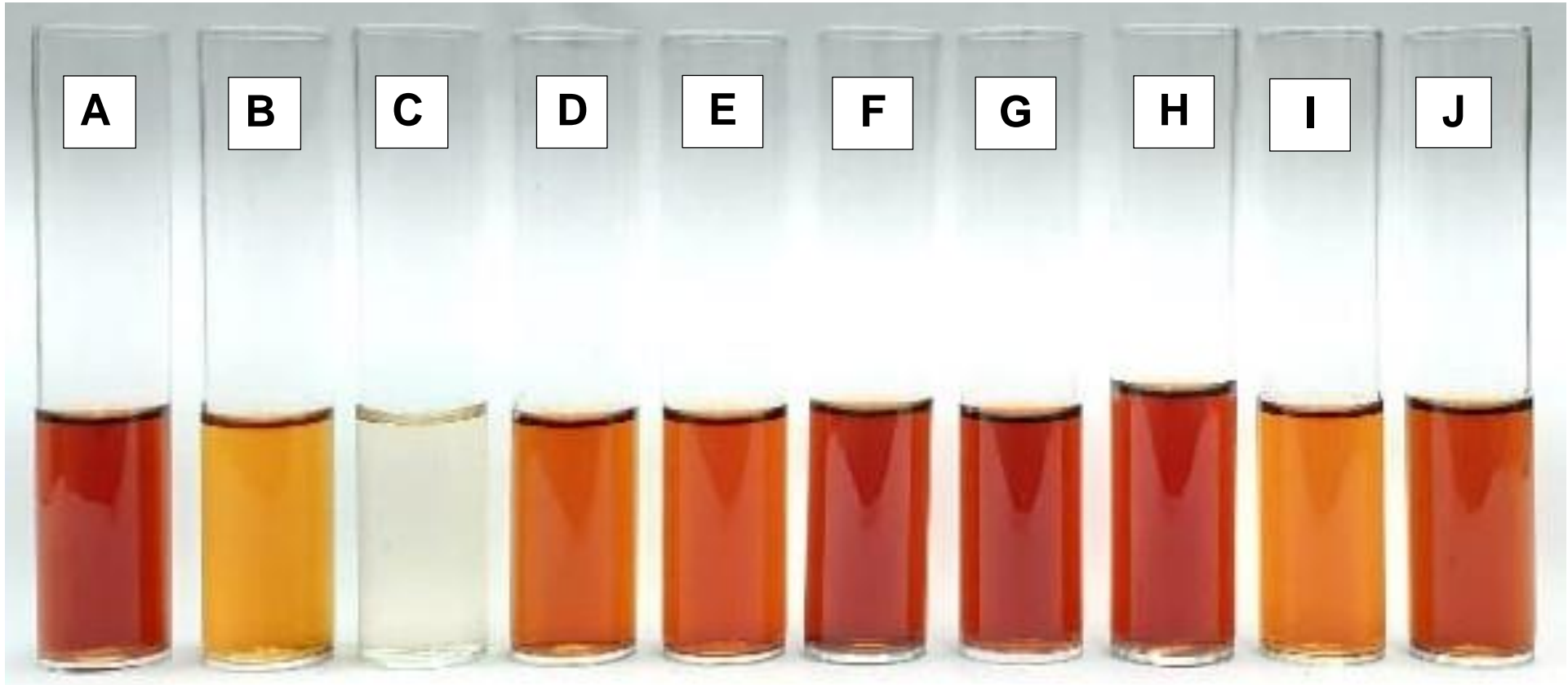
Figura 15-Filtrados (Extratos Brutos) do fungo *Trichoderma sp.* (CFAM 792)



Fonte: A Autora (2020).

Nota: A= 27°C; B= 37°C; C=47°C; D= pH 4,5; E= pH 5,5; F= pH 6,5; G= pH 7,5; H= Ausência de luz; I= Pouca luz; J= Muita luz

Figura 16-Filtrados (Extratos Brutos) do fungo *Trichoderma sp.* (CFAM 1163)



Fonte: A Autora (2020).

Nota: A= 27°C; B= 37°C; C=47°C; D= pH 4,5; E= pH 5,5; F= pH 6,5; G= pH 7,5; H= Ausência de luz; I= Pouca luz; J= Muita luz

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana

As 5 cepas de *Trichoderma spp.* (CFAM 1210; CFAM 1144; CFAM 1162; CFAM 0792; CFAM 1163) selecionadas nos testes anteriores, também foram avaliadas quanto à sua possível atividade antibacteriana. Os microrganismos usados como alvos nas análises, por serem patógenos humanos representativos, foram as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* CBAM 0001, *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 0665, *Klebsiella pneumoniae* CBAM0672 e a gram-positiva *Bacillus cereus* CBAM 0549.

5.2.1 Triagem Inicial (Método do Bloco de Gelose)

A avaliação da atividade antibacteriana dos fungos citados iniciou-se por uma triagem, através do Método do Bloco de Gelose, para serem escolhidos os que iriam continuar no estudo, em virtude do material e do tempo disponível. Apenas dois dos cinco fungos, *Trichoderma virens* (CFAM 1144) e o *Trichoderma sp.* (CFAM 1162) (TABELA 13), apresentaram uma zona clara de inibição (Halo) na superfície do meio, onde as bactérias foram cultivadas.

O *Trichoderma virens* (CFAM 1144) produziu os halos de inibição com os maiores diâmetros e contra um maior número de bactérias em comparação com o *Trichoderma sp.* (CFAM 1162) (TABELA 9).

O CFAM 1144 produziu halos com diferença estatística entre si, mostrando uma possível maior ação antibacteriana contra a *E. coli* CBAM 0001 (19,68 mm), em segundo lugar contra a *P. aeruginosa* CBAM 0665 (15,53 mm) e em terceiro contra o *B. cereus* CBAM 0549 (10,80 mm). O CFAM 1162, ao contrário, não apresentou diferença estatística significativa entre os dois halos formados por eles, contra *E.coli* e *B.cereus*, o que impossibilita a verificação de qual bactéria teria sido mais sensível a ação desse fungo.

Saleh *et al.* (2011) também avaliou uma cepa de *T. virens*, quanto a sua ação antibacteriana, e verificou que ela produziu zonas de inibição, com média de 12 mm de diâmetro, para uma das cepas de *E. coli*, similar ao do estudo atual. Porém, não formou halo para a *P. aeruginosa* nem para *K. pneumoniae*, diferente do apresentado pelo CFAM 1144.

Tabela 13-Resultados do teste do bloco de gelose de fungos *Trichoderma* spp. contra bactérias patogênicas com os diâmetros dos halos de inibição produzidos.

Fungos	Bactérias Patogênicas				Médias
	<i>Escherichia coli</i> CBAM 0001	<i>Bacillus cereus</i> CBAM 0549	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CBAM 0665	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CBAM 0672	
	-----Médias (mm) ± DP -----				
<i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1210	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ¹
<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144	19,7 ± 0,8 ^c	10,8 ± 0,8 ^a	15,5 ± 0,3 ^b	0,00	11,50 ± 8,48 ³
<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1162	11,7 ± 0,9	9,5 ± 1,1	0,00	0,00	5,3 ± 6,18 ²
<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0792	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ¹
<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1163	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ¹

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (Comparação entre bactérias); ^{1,2,3} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (Comparação entre os fungos) (P<0,05).

Sendo assim, ou são cepas diferentes de uma mesma espécie ou são espécies diferentes que produzem o mesmo colorante. Até o momento, o fato de serem ou não da mesma espécie não foi possível afirmar, em virtude de uma dificuldade histórica na diferenciação entre as espécies do gênero *Trichoderma* (OLIVEIRA, 2019; RAMOS; SAID, 2011).

Poucos trabalhos, referentes ao potencial antibiótico do gênero *Trichoderma* contra patógenos humanos, foram publicados nos últimos tempos. De modo geral, os pesquisadores preferem estudar a promoção do crescimento vegetal e o controle biológico de fitopatógenos realizados por esse gênero (ABREU; PFENNING, 2019).

Saleh *et al.* (2011) também avaliaram uma cepa de *Trichoderma harzianum*, que produziu halos de inibição contra *E. coli*, para a *P. aeruginosa* e para a *K. pneumoniae*. Esse cenário foi diferente do *T. harzianum* (CFAM 1210), do presente estudo, que não formou nenhuma zona de inibição.

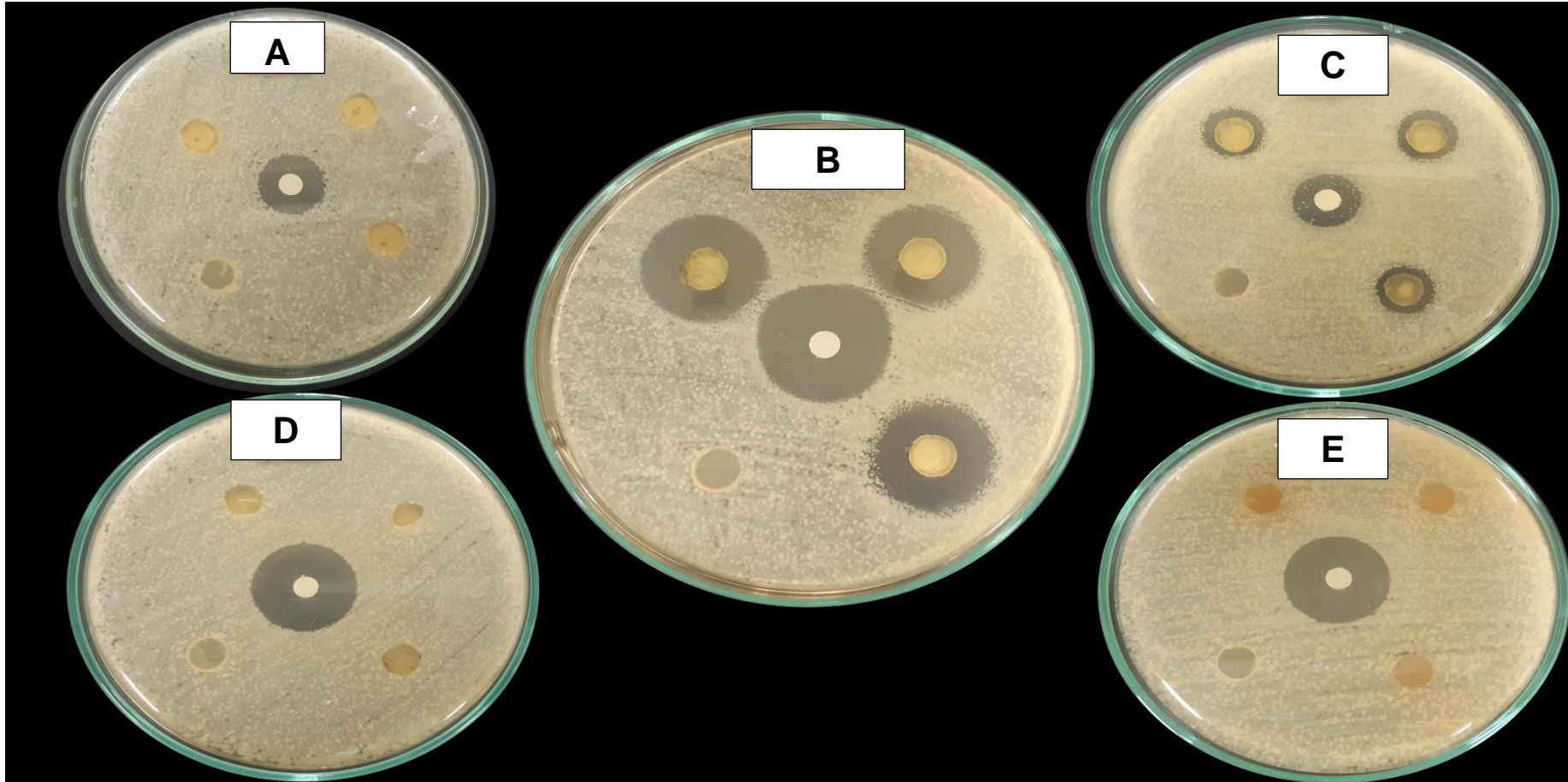
Importante destacar, que os testes posteriores são necessários, também, para verificar se os halos não foram maiores ou se não houve formação de halo devido ao peso molecular da substância produzida (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019).

Isso porque, apesar da ocorrência dessa zona indicar presença de antibiótico e quanto maior for essa zona, maior seria a atividade do composto, se ele possuir alto peso molecular, a velocidade de difusão no meio de cultura é afetada, especialmente, se ele for pouco polar. Como consequência, o tamanho do halo seria reduzido e não indicaria o real potencial, bactericida ou bacteriostático, dos metabólitos dos fungos avaliados (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019).

Bona *et al.* (2014) realizaram testes com extratos vegetais, tanto no método de microdiluição em caldo quanto no método de difusão em ágar, e algumas das amostras mostraram ter atividade no primeiro método e no segundo não.

Dessa forma, a divergência de atuação em alguns pontos, entre o presente estudo e o de Saleh *et al.* (2011), pode ter ocorrido por diversos motivos. Um deles é o uso de diferentes cepas, tanto dos fungos, quanto das bactérias, outro é o método usado na produção do halo, que no caso de Saleh *et al.* (2011) foi o de perfuração em ágar ou em poço, com inoculação de extratos brutos oriundos de uma fermentação em estado sólido, no meio CYS80, com posterior filtração e centrifugação.

Figura 17- Placas da avaliação antibacteriana pelo Método do Bloco de Gelose de cepas do *Trichoderma spp* contra a bactéria *E. coli* (CBAM 0001)



Fonte: A Autora (2020).

Nota: A= *Trichoderma harzianum* CFAM 1210; B= *Trichoderma virens* CFAM 1144; C=*Trichoderma sp.* CFAM 1162; D= *Trichoderma sp.*CFAM 0792; E= *Trichoderma sp.* CFAM 1163.

No artigo publicado por Ratnaweera *et al.* (2018) não houve formação de halo contra a *E. coli* e *P. aeruginosa*, mas houve contra *B. cereus*, com diâmetro de 15 mm, porém foi utilizado extrato bruto dos *Trichodermas* isolados.

Além de serem fungos isolados de outra localização geográfica, Sri Lanka, o que pode levar a diferenças genéticas, houve diferença na metodologia aplicada, pois no estudo atual, a triagem foi feita diretamente com o fungo e no estudo de Ratnaweera *et al.* (2018) foi feita com o extrato bruto, o que pode gerar diferenças nos resultados encontrados.

Em contrapartida, Ratnaweera *et al.* (2018) mostraram haver potencial inibitório contra o *Bacillus cereus*, por parte do *T. virens* isolado por eles, confirmando os resultados do *T. virens* CFAM 1144.

No atual estudo, apesar das placas referentes a *Klebsiella pneumoniae* (CBAM 0672) não terem apresentado a formação de halo por nenhum dos fungos, foi mantida nos testes posteriores. Isso ocorreu com o intuito de observar se as condições de cultivo submerso, na qual as cepas de *Trichoderma* spp foram expostas, iriam alterar essa aparente falta de atividade antibiótica.

Em decorrência dos resultados dessa triagem, considerando tamanho dos halos, número de bactérias inibidas, tempo e material disponível, o *Trichoderma virens* CFAM 1144 foi o fungo escolhido para prosseguir na avaliação do seu potencial antibacteriano.

5.2.2 Teste Antibacteriano em microplaca para análise dos filtrados de *Trichoderma virens* CFAM 1144

As ações dos filtrados, frente a presença das suspensões bacterianas (patógenos humanos), geraram uma média de valores de absorbância, para cada triplicata, e estão registrados nas Tabela 14, 15 e 16. Esses valores são diretamente proporcionais à presença ou ausência do crescimento desses patógenos e, como consequência, a presença ou ausência, nos filtrados, de moléculas com atividade antibacteriana.

Tabela 14- Crescimento das cepas de bactérias patogênicas na presença dos filtrados, de diferentes temperaturas, do *Trichoderma virens* CFAM 1144 expressos em valores de absorbância (595 nm).

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Bactérias Patogênicas			
	<i>Escherichia coli</i> CBAM 0001	<i>Bacillus cereus</i> CBAM 0549	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CBAM 0665	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CBAM 0672
	-----Médias (Absorbâncias) ± DP-----			
Controle Negativo*	0,48 ± 0,10 ^{b,3}	0,08 ± 0,01 ^{a,1}	0,33 ± 0,02 ^{b,23}	0,29 ± 0,07 ^{b,2}
Controle Positivo**	0,01 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
27°C	0,17 ± 0,01 ^{a,1}	0,42 ± 0,46 ^{ab,12}	0,68 ± 0,03 ^{c,12}	0,79 ± 0,02 ^{c,2}
37°C	0,06 ± 0,00 ^{a,1}	0,05 ± 0,01 ^{a,1}	0,88 ± 0,02 ^{de,3}	0,77 ± 0,01 ^{c,2}
47°C	0,96 ± 0,08 ^{c,1}	1,04 ± 0,06 ^{c,1}	0,90 ± 0,07 ^{e,1}	1,35 ± 0,04 ^{d,2}

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c,d,e} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre as bactérias) (P<0,05). *Controle Negativo: Patógeno+ Caldo Mueller Hinton; **Controle Positivo: Antibiótico + Patógeno+ Caldo Mueller Hinton.

Tabela 15-Crescimento das cepas de bactérias patogênicas na presença dos filtrados, de diferentes pHs, do *Trichoderma virens* CFAM 1144 expressos em valores de absorbância (595 nm).

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Bactérias Patogênicas			
	<i>Escherichia coli</i> CBAM 0001	<i>Bacillus cereus</i> CBAM 0549	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CBAM 0665	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CBAM 0672
	-----Médias (Absorbâncias) ± DP-----			
Controle Negativo*	0,48 ± 0,10 ^{b,3}	0,08 ± 0,01 ^{a,1}	0,33 ± 0,02 ^{b,23}	0,29 ± 0,07 ^{b,2}
Controle Positivo**	0,01 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
pH 4,5	0,88 ± 0,08 ^{c,2}	1,12 ± 0,08 ^{c,3}	0,65 ± 0,04 ^{c,1}	0,98 ± 0,04 ^{d,23}
pH 5,5	0,19 ± 0,21 ^{a,1}	0,43 ± 0,15 ^{ab,1}	0,81 ± 0,05 ^{d,2}	0,30 ± 0,02 ^{b,1}
pH 6,5	0,06 ± 0,03 ^{a,1}	0,19 ± 0,10 ^{a,1}	0,75 ± 0,03 ^{cd,2}	0,83 ± 0,07 ^{c,2}
pH 7,5	0,18 ± 0,09 ^{a,1}	0,81 ± 0,40 ^{bc,2}	0,78 ± 0,11 ^{cd,2}	0,86 ± 0,02 ^{c,2}

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c,d} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre as bactérias) (P<0,05). *Controle Negativo: Patógeno+ Caldo Mueller Hinton; **Controle Positivo: Antibiótico + Patógeno+ Caldo Mueller Hinton.

Tabela 16-Crescimento das cepas de bactérias patogênicas na presença dos filtrados, de diferentes intensidades de luz, do *Trichoderma virens* CFAM 1144 expressos em valores de absorbância (595 nm).

Tratamentos (Condições de Cultivo)	Bactérias Patogênicas			
	<i>Escherichia coli</i> CBAM 0001	<i>Bacillus cereus</i> CBAM 0549	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CBAM 0665	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CBAM 0672
	-----Médias (Absorbâncias) ± DP-----			
Controle Negativo*	0,48 ± 0,10 ^{b,3}	0,08 ± 0,01 ^{a,1}	0,33 ± 0,02 ^{b,23}	0,29 ± 0,07 ^{c,2}
Controle Positivo**	0,01 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Muita luz	0,01 ± 0,01 ^{a,1}	0,01 ± 0,00 ^{a,1}	0,87 ± 0,05 ^{d,3}	0,13 ± 0,05 ^{b,2}
Pouca luz	0,07 ± 0,04 ^{a,1}	0,25 ± 0,21 ^{a,1}	0,76 ± 0,04 ^{cd,2}	0,79 ± 0,03 ^{d,2}
Ausência de luz	0,17 ± 0,01 ^{a,1}	0,42 ± 0,46 ^{a,12}	0,68 ± 0,03 ^{c,12}	0,79 ± 0,02 ^{d,2}

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c,d} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre as bactérias) (P<0,05). *Controle Negativo: Patógeno+ CMH; **Controle Positivo: Antibiótico + Patógeno+ CMH.

Os resultados mostraram que, efetivamente, as condições de cultivo influenciaram, tanto positivamente quanto negativamente, na formação de antibióticos por parte do *Trichoderma virens* CFAM 1144. Muitos filtrados tiveram resultados sem diferença estatística entre si e entre eles com o controle positivo.

Ao contrário do que ocorreu no Teste do Bloco de Gelose, nenhum dos filtrados inibiu a *P. aeruginosa* CBAM 0665. Inclusive, essas bactérias cresceram de forma intensa em todos os poços, ficando visível a olho nu, e as médias, das absorvâncias, apresentaram diferença estatística significativa em comparação ao controle positivo.

A *K.pneumoniae* CBAM 0672, novamente, não foi inibida, mesmo diante dos filtrados de diferentes condições de cultivo, e apresentou o mesmo comportamento, da CBAM 0665, com relação ao controle positivo e negativo.

No entanto, foi mantida para a análise da Concentração Mínima Inibitória e, assim, ser verificado se ao concentrar as substâncias presentes no filtrado, através do processo da liofilização, a inibição da CBAM 0672 aconteceria.

O filtrado Muita Luz inibiu a *E. coli* CBAM 0001 e o *B. cereus* CBAM 0549, sem diferença estatística entre as duas bactérias, com absorvâncias de 0,01 para ambas, semelhantes ao Controle Positivo, que tinha presença do antibiótico Cloranfenicol 30 µg/mL.

Também o e 37°C, que apresentou atividades contra as mesmas bactérias, com médias de absorvância de 0,06 para a CBAM 001 e 0,05 para a CBAM 0549. E por fim, Pouca Luz e o pH 6,5, mas esses só inibiram a CBAM 0001, com absorvâncias de 0,07 e 0,06 respectivamente.

Esses resultados se parecem com os obtidos por Ratnaweera *et al.*(2018) e Saleh *et al.* (2011), em diferentes métodos, como o do poço, do disco e da microdiluição.

Esses quatro filtrados, oriundos do fungo *T. virens* CFAM 1144, foram selecionados para prosseguirem na avaliação de sua atividade biológica. Em virtude da falta de diferença estatística entre essas amostras e as demais, do pouco tempo e do pouco material disponível, os critérios de seleção foram a semelhança com o controle positivo, os que apresentaram menores valores e que não apresentaram diferença entre si.

Muitos foram os casos, onde as bactérias cresceram mais com o filtrado do que só com o seu próprio meio de cultura, como o filtrado pH 4,5 contra a *P.aeruginosa*

CBAM 0665 com absorvância de 0,98 contra 0,29 do Controle Negativo, composto só de patógeno + Caldo Mueller Hinton.

Então, os filtrados, ao invés de inibir, nutriram os microrganismos mais do que o próprio Caldo Mueller Hinton, um meio de cultura comumente usado no crescimento bacteriano. Esse cenário se repetiu com as bactérias CBAM 0665 e CBAM 0672, que não foram afetadas pelos extratos brutos, e tudo ocorreu devido à composição nutricional do Caldo BD, meio de cultura usado no cultivo submerso dos *Trichoderma spp.*

Diante desses resultados, observa-se que o fungo CFAM 1144 mostrou ser verdadeiramente capaz de gerar moléculas inibidoras do crescimento bacteriano, tanto da *E. coli*, quanto do *B. cereus*, confirmando o resultado do item 4.2.1.

Segundo Pan *et al.* (2019), alguns genes biossintéticos, que geram metabólitos secundários microbianos, não são expressos em condições normais de cultivo, ocorrendo a necessidade de alterá-las para ativar esses agrupamentos de genes silenciosos.

Essas alterações também podem silenciar alguns genes e alterar alguma reações bioquímicas, com conseqüente ausência de determinada substância que antes era comumente produzida (FERNANDES, R.P., 2017; PAN *et al.*, 2019).

Os ensaios que analisam a formação de halo, através do uso de extratos em discos ou em poços no meio sólido, são os mais recorrentes nas avaliações da atividade antibacteriana, com o intuito de selecionar determinados extratos microbianos e em virtude da simplicidade na avaliação dos resultados. Porém, eles possuem muitas desvantagens (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019).

São testes classificados como trabalhosos, devido ao processo de preparação das placas com meio sólido, desde a padronização do inóculo, a própria inoculação dos patógenos, a produção dos poços ou discos até a inserção dos extratos. É também um processo que gera um alto consumo de tempo e material (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019).

Enquanto os testes que contam com microplaca são mais baratos, reprodutíveis e 30 vezes mais sensíveis. Podem ser testadas diferentes amostras ao mesmo tempo, requerem pequenas quantidades e ademais, permitem que sejam obtidos dados quantitativos (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Isso, provavelmente, porque os componentes do teste estão em meio líquido, tanto a bactéria quanto as moléculas biologicamente ativas, o que propicia um maior contato entre eles, até mais do que na metodologia do poço (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019).

Outra vantagem é a não dependência quanto a capacidade da molécula de se difundir pelo ágar, de acordo com o seu peso molecular, característica lipofílica e/ou natureza química, com conseqüente formação ou ausência de zona de inibição, interferindo na avaliação correta dos resultados (BONA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019).

A avaliação estatística foi realizada para verificar se as condições de cultivo, na qual os fungos foram submetidos, influenciaram na secreção de compostos antibacterianos para o meio, selecionar quais seriam os mais promissores e enviar para a liofilização.

Também foi feita com o objetivo de comparar com o controle positivo (Antibiótico + Bactéria + Meio) e com o controle negativo (Bactéria +Meio), para observar o quanto o extrato se diferenciava estatisticamente da ação do antibiótico ou da falta dele.

5.2.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Esse ensaio possui as mesmas vantagens do item anterior, porém nos permite obter mais informações, pois, quando possível, fornece a menor concentração, do extrato bruto liofilizado, que é capaz de inibir o patógeno utilizado.

Após a verificação dessa informação, o natural seria encaminhar as concentrações que foram capazes de inibir, a partir dessa concentração mínima, para o ensaio da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Esse ensaio mostraria a menor concentração, da molécula antibacteriana presente, que mataria ao menos 99,9% das bactérias inoculadas, ou seja, não seria algo temporário. Mesmo retirando as bactérias do contato com o extrato bruto liofilizado, elas não voltariam a crescer, se voltassem, na verdade aquela concentração seria bacteriostática (GUIMARÃES *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2019).

No entanto, os extratos brutos liofilizados não inibiram nenhuma das 4 bactérias, ou seja, foram resistentes (R) (TABELA 17).

Tabela 14-Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos Filtrados do *Trichoderma virens* CFAM 1144 contra 4 patógenos humanos significativos

Bactérias	Fungo/Filtrados			
	<i>Trichoderma virens</i> CFAM 1144			
	Muita Luz	Pouca luz	37°C	pH 6,5
	-----CMI (mg/mL) -----			
<i>Escherichia coli</i> CBAM 0001	R	R	R	R
<i>Bacillus cereus</i> CBAM 0549	R	R	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CBAM 0665	R	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CBAM 0672	R	R	R	R

Fonte: A Autora

Nota: R=Resistente. CMI: Concentração Mínima Inibitória.

Além disso, por vezes, cresceram mais nos poços com os extratos, do que no controle negativo, que tinha apenas a bactéria e o meio de cultura, de forma semelhante ao que ocorreu no item anterior (5.2.2).

Dessa forma, não foi possível seguir para o ensaio do CBM, inclusive, o CMI foi refeito, mais de uma vez, para confirmar se não foi problema de contaminação e os resultados se mantiveram, ou seja, a molécula foi perdida.

Com o intuito de verificar se foi a liofilização que teria causado essa perda, o teste do item anterior (5.2.2) também foi refeito, e os extratos, que tinham sido selecionados, deixaram de apresentar atividade antibacteriana, pois todas as bactérias cresceram, o que nos permitiu descartar essa possibilidade.

Então, foi admissível conceber que a ação antimicrobiana dos filtrados, no ensaio anterior, foi fruto da ação de antibiótico volátil. A possibilidade se mostra plausível porque já é conhecido, pela comunidade científica, o fato de diversas espécies de *Trichoderma sp.* produzirem metabólitos secundários voláteis, inclusive antibióticos, bastante utilizado por ele no processo de antibiose (ABREU; PFENNING, 2019; ANGEL *et al.*, 2016; AWAD *et al.*, 2018; SILVA, *et al.*, 2019).

Esses compostos orgânicos voláteis são tão importantes, que não só atuam diretamente como indiretamente, quando servem como gatilho, algo que acontece durante o contato inicial com um fitopatógeno, para o processo de micoparasitismo se desenvolver (ANGEL *et al.*, 2016; AWAD *et al.*, 2018; RAMADA; LOPES; ULHOA, 2019).

Entre esses compostos, a 6-pentil-pirona (6PP) é a mais conhecida, por também ser responsável pelo aroma de coco e pela pigmentação amarela formada

por algumas espécies (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019; RAMADA; LOPES; ULHOA, 2019).

Os antibióticos produzidos por esse gênero são divididos em 3 categorias: Antibióticos voláteis, compostos solúveis em água e peptaibols. Uma classe desses antibióticos voláteis é denominada de policetídeos e, dentro desse grupo, dependendo da modificação estrutural presente, poder ser classificada como uma benzoquinona (RAMADA; LOPES; ULHOA, 2019).

As substâncias, que formam essa classe, são bastante voláteis, com efeito antagonista e que atuam contra bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Um exemplo desse grupo é a Aurantiogliocladina (RAMADA; LOPES; ULHOA, 2019).

Essa análise permitiu descartar completamente, a possibilidade dos colorantes presentes possuírem atividade antibiótica, o que poderia auxiliar na indústria alimentícia e cosmética.

Pois, além dos colorantes naturais estarem sendo exigidos nos alimentos industrializados, o consumidor também passou a cobrar a redução de conservantes químicos sintéticos. Essa exigência do mercado forneceu, para a indústria, o grande desafio de conseguir também colorantes com efeito antimicrobiano e até antioxidante, mas que não sejam tóxicos. Além disso, alguns consumidores também desejam algum efeito benéfico direto para o corpo humano (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016).

6 CONCLUSÕES

As condições de cultivo não influenciaram da mesma forma na produção de biomassa e de colorantes das cinco cepas do gênero *Trichoderma*.

Nenhuma das cinco linhagens conseguiu crescer e produzir colorantes a 47°C.

Quanto à atividade antibacteriana, o fungo mais promissor foi o *Trichoderma virens* CFAM 1144.

Houve influência das condições de cultivo na produção de compostos antibióticos nos filtrados, deixando de ter atividade contra a *P. aeruginosa*.

Os extratos produzidos sob Muita Luz, Pouca Luz, 37°C e pH 6,5 apresentaram, ao longo dos testes, perda de atividade antibacteriana.

Foi produzido um composto antibiótico, no cultivo submerso, eficiente contra a *Escherichia coli* CBAM 0001 e contra *Bacillus cereus* CBAM 0549.

Os colorantes produzidos não foram os responsáveis pela ação antibacteriana.

Estudos como esses são importantes para futuras pesquisas visando maior formação de biomassa e/ou maior produção de colorante.

7 REFERÊNCIAS

ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. O Gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (eds.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 163–179.

AGUIAR, A. R. *et al.* Efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de *Allium cepa*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 3, p. 934–940, 2015.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5979–5987, 2009.

AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B. V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1631–1643, 2016.

ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de Screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, no 134, p. 1–7, 2010.

ANGEL, L. P. L. *et al.* An in vitro study of the antifungal activity of *Trichoderma virens* 7b and a profile of its non-polar antifungal components released against *Ganoderma boninense*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 732–744, 2016.

ARAÚJO, I. F. *et al.* Efeito do pH na atividade de lacase e na descoloração de corantes industriais por extrato enzimático de *Panus lecomtei*. **Scientia Amazonia**, v. 8, n. 3, p. 6–15, 2019.

ARAÚJO, L. G. **Infecções de Corrente Sanguínea causadas por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em hospitais terciários de Salvador, Bahia: Caracterização epidemiológica e clínica**. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)-Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; AHMAD, W. A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 168–182, 2018.

AWAD, N. E. *et al.* Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. **Mycology**, v. 9, n. 1, p. 70–80, 2018.

BANIN, E.; HUGHES, D.; KUIPERS, O. P. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 450–452, 2017.

BARCHITTA, M. *et al.* The “Obiettivo Antibiotico” campaign on prudent use of

antibiotics in Sicily, Italy: The pilot phase. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 9, p. 1–10, 2020.

BETTIOL, W. *et al.* Produtos comerciais à base de Trichoderma. *In*: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (eds.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 43–160.

BILAL, R. M. H *et al.* Elliptical metallic rings-shaped fractal metamaterial absorber in the visible regime. **Scientific Reports**, v. 10, n. 14035, p. 1–12, 2020.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, p. 1–32, 2016.

BISSETT, J. A revision of the genus Trichoderma . I. Section Longibrachiatum sect. nov. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, n. 5, p. 924–931, 1984.

BONA, E. A. M. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

BRIGANTINI, L. C.; MARQUES, G. J.; GIMENES, M. Antibióticos em odontologia. **Revista UNINGÁ**, v. 49, p. 121–127, 2016.

BROWN, T. L. *et al.* **Química: A Ciência Central**. 13ª ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2016.

BROWN, T. L. *et al.* **Química: A ciência central**. 9ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

CARRERAS-VILLASEÑOR, N.; SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J.A.; HERRERA-ESTRELLA, A.H. Trichoderma: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v.158, p.3-16, 2012.

CELESTINO, J. R. **Bioprospecção de fungos de amostras de solo amazônico com potencial para a produção de pigmentos**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

CELESTINO, J. R. 86 f. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. **Hypocrea / Trichoderma (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae)**: Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, v. 48, p. 101-119, 2003.

CHEN, D. *et al.* Robust CsPbX₃ (X = Cl, Br, and I) perovskite quantum dot embedded glasses: nanocrystallization, improved stability and visible full-spectral tunable emissions. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 6, n. 47, p. 12864–12870, 2018.

CHITALE, A. *et al.* Production & characterization of brown coloured pigment from *Trichoderma viride*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, no. 5, p. 529–537, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE- CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - ninth edition**. CLSI document M07-A9. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 45–57, mai./ago. 2017.

COSTA, J. P. V. **Soro de queijo como substrato potencial à produção de pigmentos por *Monascus ruber***. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola de Agronomia-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

CRIZEL, R. L. **Prospecção de pigmentos produzidos por cochonilhas *Ceroplastes spp.* para aplicação em alimentos**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

DEZFULLY, N. K.; HEIDARI, A. Natural Bioactive Compounds: Antibiotics. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 8, n. 2S, p. 674–684, 2016.

FABIAN, M. C.; FRIGHETTO, M.; BORGONI, T. C. B. Avaliação da resistência de determinadas bactérias a antimicrobianos em uroculturas de laboratório de análises clínicas no município de Videira, SC. **Unoesc & Ciência - ACBS**, Joaçaba, v. 9, n. 1, p. 29–38, jan./jun. 2018.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century richard. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25–64, 2014.

FENTA, L.; MEKONNEN, H.; GASHAW, T. Biocontrol potential of trichoderma and yeast against post harvest fruit fungal diseases : A review. **World News of Natural Sciences**, vol. 27, p. 153–173, out. 2019.

FERNANDES, A. L. **Antibióticos do Século XX - Ascensão e Declínio**. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade do Algarve, Algarve, 2017.

FERNANDES, R. P. **Estudo do comportamento em co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae* isolados de *Senna spectabilis***. 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual paulista, Araraquara, 2017.

FERREIRA, H. K. *et al.* Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp G-27 contra microrganismos de interesse clínico. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 3, n. 6, p. 367–373, 2016.

FERREIRA, W. M. *et al.* Corantes: Uma Abordagem com Enfoque Ciência, Tecnologia e Sociedade (CTS) Usando Processos Oxidativos Avançados. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 249–257, nov. 2018. .

FRANCISCO, M. R. **Seleção e identificação de Trichoderma spp. e potencial para produção de enzimas industriais**. 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rura do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

FUCK, W. F. **Seleção de Biocorantes de Fungos Filamentosos para Tingimento de Couro e Cultivo Submerso de M. purpureus com Substrato de Pelo Hidrolisado**. 2018. 132 f. Tese (Doutorado em Engenharia)- Escola de Engenharia, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

FURTADO, D. M. F. *et al.* Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.10, p. 1–8, 2019.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of Trichoderma. *In*: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (eds.). **Trichoderma & Gliocladium Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics**. Taylor & Francis, 2002. v.1, p. 3–34.

GELLEN, L. F. A. *et al.* Potencial Farmacoindustrial de Trichoderma harzianum para fins Farmacoterapêuticos. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, n. 4, p. 91–96, 2014.

GHAZANFAR, M. U.; RAZA, M.; RAZA, W. Effect of physiological parameters on mass production of Trichoderma species. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 59–65, 2018.

GLASSET, B. *et al.* Bacillus cereus, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. 1–19, mai. 2018.

GMOSER, R. *et al.* Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 1–25, 2017.

GMOSER, R. *et al.* Pigment Production by the Edible Filamentous Fungus Neurospora Intermedia. **Fermentationn**, vol. 4, no. 11, p. 1–15, 2018.

GOMPERTZ, O. F. *et al.* Estrutura, Morfologia, Reprodução e Taxonomia dos Fungos. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. (eds.). **Microbiologia**. 6ªed. São Paulo: Atheneu, 2015. p. 577–584.

GOULD, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 572–575, 2016.

GOYAL, S.; RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M. Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview. *In*: MÉRILLON, J.-M.; RAMAWAT, K. G. (eds.). **Fungal Metabolites**. Springer International Publishing Switzerland, 2017. p. 1–29.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância

terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUPTA, C. *et al.* Pigment Production From *Trichoderma* Spp. for Dyeing of Silk and Wool. **International Journal of Science and Nature**, v. 4, n. 2, p. 351–355, 2013.

HEER, K.; SHARMA, S. Microbial Pigments as a Natural Color: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 5, p. 1913–1922, 2017.

HENRIQUE, F. R. *et al.* Luz à primeira vista: um programa de atividades para o ensino de óptica a partir de cores. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 41, n. 3, p. 1–7, 2019.

HERNÁNDEZ, V. A. *et al.* Fungal dyes for textile applications: testing of industrial conditions for wool fabrics dyeing. **The Journal of the Textile Institute**, v. 110, n. 1, p. 61–66, 2019.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A. W.; WILKISON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019.

ICHIKAWA, T. *et al.* Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 16, n. 3, p. 218–224, 1971.

INGLIS, P. W. *et al.* *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. **PLoS ONE**, vl. 15, n. 3, p. 1–23, mar. 2020.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, p. 1–91, 2009.

JÚNIOR, J. G. S. *et al.* Automedicação com antibióticos e suas consequências fisiopatológicas: Uma revisão. **Revista Rios Saúde**, v. 1, n. 1, p. 7–17, 2018.

JUNIOR, M. L.; MACHADO-ROSA, T. A.; GERALDINE, A. M. Uso de *Trichoderma* na cultura do feijão-comum. *In*: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (eds.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 393–406.

KANG, B. *et al.* Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 50–57, 2014.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: Regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 167–180, mar. 2019.

KISCHKEL, B. *et al.* Produção de pigmentos extracelulares por espécies de *Fusarium* e *Aspergillus*. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 16, n. 4, p. 115–119, 2018.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of *Trichoderma*. *In*: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (eds.). **Trichoderma & Gliocladium Volume 1: Basic biology, taxonomy and**

genetics. Taylor & Francis, 2002. v.1, p. 57–74.

KOURKOUTA, L. *et al.* History of antibiotics research. **Sumerianz Journal of Medical and Healthcare**, v. 1, n. 2, p. 51–54, 2018.

KUMAR, A. *et al.* Industrially Important Pigments from Different Groups of Fungi. *In*: YADAV, A.; SINGH, S.; MISHRA S.; GUPTA, A. (eds.). **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi Volume 2: Perspective for Value-Added Products and Environments**. Springer, 2019. p. 285–301.

KUMAR, A.; VISHWAKARMA, H. S.; SINGH, J.; DWIVEDI, S.; KUMAR, M. Microbial Pigments: Production and Their Applications in Various Industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 203–212, 2015.

LEELAVATHI, M.; VANI, L.; REENA, P. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 96–103, 2014.

LIMA, C. A. **Bioprospecção de fungos com potencial para a produção de colorantes naturais**. 2018. 65 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos)-Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2018.

LIMA, C. M. A. O. Informações sobre o novo coronavírus (COVID-19). **Radiologia Brasileira**, v. 53, n. 2, p. 18–19, 2020.

LISBOA, D. C. V. **Biorremediação de efluentes de lavanderias têxteis por espécies de *Trichoderma* da micoteca URM produtoras de enzimas oxidativas**. 2017. 103 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos)- Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

LOCATELLI, G. O. *et al.* Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. **Biological Control**, p. 21–29, 2018.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breve notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

LUCARINI, A. C. *et al.* Estudo da Extração de Corante Natural que confere proteção ultravioleta em fibras naturais. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 2, p. 82–94, 2017.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274–288, jan./jun. 2012.

MALDONADO, M. C.; IBARRA, L. V. Colorantes orgânicos de hongos y líquenes. **Scientia-CUCBA**, v. 8, n. 2, p. 141–161, 2006.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A Química e as Cores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1508–1534, 2015.

MASCARIN, G. M. *et al.* Produção Industrial de Trichoderma. *In*: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (eds.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 255–274.

MATUSZEWSKA, A. *et al.* Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–14, jun. 2018.

MEJIA, E. G. *et al.* The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 145–182, 2020.

MONGA, D. Effect of carbon and nitrogen sources on spore germination, bio-mass production and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium*. **Indian Phytopathology**, v. 54, n. 4, p. 435–437, 2001.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. *In*: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (eds.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 181–199.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 35–45, 2012.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Trichoderma* Research in the Genome Era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 105–129, 2013.

MUTAWILA, C. *et al.* Isolation, production and in vitro effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. **Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 104–113, 2016.

MUZAMMIL, S. *et al.* Nanoantibiotics: Future nanotechnologies to combat antibiotic resistance. **Frontiers in Bioscience - Elite**, v. 10, n. 2, p. 352–374, 2018.

NEETHU, K. *et al.* A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 03, n. 08, p. 1160–1166, 2012.

NEGREIROS, M. A. **Avaliação de meios e condições de cultivo de fungos filamentosos Amazônicos em um programa de triagem de antimicrobianos**. 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos)-Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2020.

NEVES, M. R. **Produção de colorantes e atividade biológica de Esclerotiorina**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

NICOLAOU, K. C.; RIGOL, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 2, p. 153–184, fev. 2018.

NUNES, J. F. R. **Estudo da interação entre Trichoderma harzianum e Phaseolus vulgaris utilizando a técnica de transformação aleatória por Agrobacterium tumefaciens**. 2018. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana)-Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

OGBONNA, C. N. Production of food colourants by filamentous fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 26, p. 960–971, 2016.

OLIVEIRA, C. F. D. **Produção de pigmentos por Monascus ruber CCT 3802 a partir do xarope de Maltose como substrato**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola de Agronomia, Universidade Federal do Amazonas, Goiânia, 2017.

OLIVEIRA, K. K. C. **Atividade antibacteriana de recursos naturais contra Staphylococcus aureus**. 2019. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

OLIVEIRA, L. A. **Produção, isolamento e identificação de colorantes produzidos por fungos isolados de amostras do solo amazônico**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais)-Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.

OSIMANI, A.; AQUILANTI, L.; CLEMENTI, F. Bacillus cereus foodborne outbreaks in mass catering. **International Journal of Hospitality Management**, v. 72, p.145–153, 2018.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 301–307, abr./jun. 2008.

PAMPHILE, J. A. *et al.* Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: O caso do Colletotrichum sp. **Revista UNINGÁ**, v.53, n. 1, p. 113–119, jul./set. 2017.

PAN, R. *et al.* Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v.10, n. 294, p. 1–20, fev. 2019.

PANSA, C. C. **Trichoderma spp. de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas celulolíticas**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

PEIXOTO, F.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Corantes têxteis: uma revisão. **HOLOS**, v. 5, n. 29, p. 98–106, 2013.

PEREIRA, E. L.; OLIVEIRA, A. F. A. A Produção De Antibióticos Por Processos Fermentativos Aeróbios. **Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p.1058–1078, ago./dez. 2016.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes Artificiais Em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 14, n. 2, p. 237–250, 2003.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. Microbial biotechnology: Rapid advances in an area of massive impact. **Advanced Biotech**, p. 19–25, dez. 2008.

RAMADA, M. H. S.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J. Trichoderma: Metabólitos Secundários. *In*: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (eds.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 201–2018.

RAMOS, A. S.; FIAUX, S. B.; LEITE, S. G. F. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 712–717, 2008.

RAMOS, H. P.; SAID, S. Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 02, n. 06, p. 443–449, 2011.

RAO, M. P.; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, jun. 2017.

RATNAWEERA, P. B. *et al.* Antibacterial activities of endophytic fungi isolated from six sri lankan plants of the family cyperaceae. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 264–272, 2018.

RIBEIRO, M. S. **Caracterização funcional do gene gluc31 que codifica uma β -1, 3-glucanase da família GH16 de *Trichoderma harzianum***. 2017. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

ROCHA, J. R. **Estudo da Evolução Metabólica do Filtrado da Cultura e 5-metilmeleina em micélio do Fungo Endofítico *Phomopsis* sp.** 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)- Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

RODRIGUES, T. S. Resistência Bacteriana á Antibióticos na UTI Resistência Bacteriana á Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde (REPIS)**, v. 4, n. 7350, p. 1–17, 2018.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 20–26, 2016.

SALDANHA, D. M. S.; SOUZA, M. B. M.; RIBEIRO, J. F. O uso indiscriminado dos antibióticos: Uma abordagem narrativa da literatura. **Revista Interfaces da Saúde**, v. 5, n. 1, p. 12–37, jun. 2018.

SALEH, R. M. *et al.* Screening and production of antibacterial compound from *Trichoderma* spp . against human-pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 13, p. 1619–1628, jul. 2011.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics , the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195–206, 2006.

SAMUELS, G. J. *et al.* *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 146–170, 2002.

SANTOS-EBINUMA, V. C. **Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275**. 2013. 223 f. Teses (Doutorado em Tecnologia e Bioquímico-farmacêutica)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SANTOS, R. R. C. **Influência do estresse físico-químico e biológico na produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679**. 2018. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

SARAVANAKUMAR, K. *et al.* Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 338–342, 2018.

SARON, C.; FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124–128, 2006.

SARVAMANGALA, D.; APARNA, S. S. V. Microbial Pigments-A Short Review. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food technology**, v. 10, n. 8, p. 1–7, 2016.

SCHMOLL, M.; ESQUIVEL-NARANJO, E.U.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* in the light of day-Physiology and development. **Fungal Genetics and Biology**, v.47, p.909-916, 2010.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–799, 2010.

SEN, T.; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward. **Frontiers in Nutrition**, v. 6,n.7, p. 1–14, mar. 2019.

SHARMA, D. *et al.* Pigment extraction from fungus for textile dyeing. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 37, n. 1, p. 68–73, mar., 2012.

SHARMA, S. *et al.* *Trichoderma*: Biodiversity, ecological significances, and industrial applications. *In*: YADAV, A. N. *et al.* (eds.). **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives**.

Springer, 2019. v. 1, p. 85–120.

SHENTU, X. P. *et al.* The elicitation effect of pathogenic fungi on trichodermin production by trichoderma brevicompactum. **The Scientific World Journal**, 2013.

SHI, X. S. *et al.* Antimicrobial polyketides from: Trichoderma koningiopsis QA-3, an endophytic fungus obtained from the medicinal plant Artemisia argyi. **RSC Advances**, v. 7, n. 81, p. 51335–51342, 2017.

SIDDIQUEE, S. **Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions**. Springer, 2017.

SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 261–280, 2017.

SILVA, J. R. *et al.* Produção de Pigmentos de Monascus ruber CCT 3802 utilizando casca de mandioca como substrato. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 8, n. 3, p. 26–31, 2018.

SILVA, R. N. *et al.* Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal Biology**, v. 123, n. 8, p. 565–583, 2019.

SILVA, T. R. **Prospecção de antibióticos e pigmentos a partir de bactérias isoladas da Antártica**. 2018. 155 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

SILVA, W. S. **Produção de pigmentos fúngicos e seu uso no tingimento de tecidos**. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável)-Universidade Federal de São João Del-Rei, Ouro Branco, 2013.

SILVEIRA, L. M. **Introdução à Teoria da Cor**. 2ª. Curitiba: Editora UTFPR, 2015.

SOARES, D. A.; PIMENTA, R. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de pigmentos extracelulares produzidos por fungos endofíticos. **Journal of bioenergy and food science**, v. 2, n. 4, p. 152–155, 2015.

SPLITSTOSER, J. C. *et al.* Early pre-Hispanic use of indigo blue in Peru. **Science Advances**, v. 2, n. 9, p. 1–5, 2016.

STEYAERT, J. M. *et al.* Asexual development in Trichoderma; From Conidia to Chlamydospores. *In*: MUKHERJEE, P. K. *et al.* (eds.). **Trichoderma: Biology and Applications**. Boston: CAB Internacional, 2013. p. 400.

TAKAHASHI, J. A. *et al.* Fungos Filamentosos e Química : Velhos Conhecidos , Novos Aliados Fungos. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 32, 2017.

TEIXEIRA, M.F.S. *et al.* **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas)**. 1ª ed. Manaus: EDUA. 2011.

TORRES, S. A. O. **Caraterização da influência dos corantes nas propriedades físicas das tintas e durabilidade de cor**. 2018. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica)- Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2018.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12^aed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TOUATI, I. *et al.* Hyporientalin A, an anti-Candida peptaibol from a marine Trichoderma orientale. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 7, 2018.

TRIPATHI, P. *et al.* Arsenic tolerant Trichoderma sp. reduces arsenic induced stress in chickpea (*Cicer arietinum*). **Environmental Pollution**, v. 223, p. 137–145, 2017.

VELMURUGAN, P. *et al.* T. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, p. 1–7, 2009.

VIERA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; ROCA, M. Green natural colorants. **Molecules**, v. 24, n.154, 2019.

WAGHUNDE, R. R.; SHELAKE, R. M.; SABALPARA, A. N. Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–1965, jun. 2016.

YUSUF, M.; SHABBIR, M.; MOHAMMAD, F. Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, n. 1, p. 123–145, 2017.

ZAGUI, G. S. **Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluente hospitalar e urbano**. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

ZAMAN, S. B. *et al.* A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**, v. 9, n. 6, p. 1–9, jun. 2017.

ZEHRA, A. *et al.* Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some Trichoderma species. **Journal of Enviromental Biology**, v. 38, n. 2, p. 197–203, mar. 2017.

ZENEON, O. *et al.* Determinação de metais presentes em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 56–62, 2004.

APÊNDICE A- RESULTADOS (ABSORBÂNCIAS) ORIUNDOS DA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO, EM UM LEITOR DE MICROPLACA (595NM), PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE FILTRADOS DO *Trichoderma virens* CFAM 1144 CONTRA 4 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE INTERESSE MÉDICO *E. coli* CBAM 0001; *B.cereus* CBAM 0549; *P. aeruginosa* CBAM 0665; *K.penumoniae* CBAM 0672

CONCENTRAÇÕES (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i> CBAM 0001				p
	F1	F2	F3	F4	
	-----Médias (Absorbâncias) ± DP-----				
5,0 mg/mL	0,814 ± 0,00 ^{e,3}	0,748 ± 0,02 ^{c,2}	0,704 ± 0,03 ^{d,12}	0,663 ± 0,01 ^{f,1}	<0,001
2,5 mg/mL	0,920 ± 0,03 ^{e,3}	0,751 ± 0,01 ^{c,2}	0,862 ± 0,03 ^{e,3}	0,651 ± 0,02 ^{f,1}	<0,001
1,25 mg/mL	0,904 ± 0,02 ^{e,3}	0,804 ± 0,03 ^{c,2}	0,660 ± 0,03 ^{cd,1}	0,689 ± 0,01 ^{g,1}	<0,001
0,63 mg/mL	0,894 ± 0,02 ^{e,2}	0,808 ± 0,04 ^{c,2}	0,682 ± 0,06 ^{cd,1}	0,645 ± 0,00 ^{f,1}	<0,001
0,31 mg/mL	0,801 ± 0,04 ^{e,3}	0,788 ± 0,03 ^{c,3}	0,647 ± 0,04 ^{cd,2}	0,521 ± 0,01 ^{e,1}	<0,001
0,16 mg/mL	0,598 ± 0,13 ^d	0,643 ± 0,02 ^d	0,593 ± 0,03 ^c	0,473 ± 0,01 ^d	0,062
0,08 mg/mL	0,224 ± 0,09 ^{b,1}	0,530 ± 0,06 ^{c,2}	0,478 ± 0,02 ^{b,2}	0,427 ± 0,01 ^{c,2}	0,001
Controle Positivo	0,011 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	1,000
Controle Negativo	0,389 ± 0,00 ^c	0,389 ± 0,00 ^b	0,389 ± 0,00 ^b	0,389 ± 0,00 ^b	1,000
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c,d,e,f,g} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3,4} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (Comparação entre os filtrados) (P<0,05).

F.1: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* CFAM 1144 cultivado com muita Luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.2: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* CFAM 1144 cultivado com pouca luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.3: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* CFAM 1144 cultivado com ausência de luz, 37°C e pH 6,0 em meio BD

F.4: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* CFAM 1144 cultivado com ausência de luz, 27°C e pH 6,5 em meio BD

Controle Positivo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno + Antibiótico (Cloranfenicol 30 µg/mL)

Controle Negativo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno

CONCENTRAÇÕES (mg/mL)	<i>Bacillus cereus</i> CBAM 0549				
	F1	F2	F3	F4	p
	-----Médias (Absorbâncias) ± DP-----				
5,0 mg/mL	0,620 ± 0,01 ^{c,2}	0,622 ± 0,02 ^{bc,2}	0,529 ± 0,01 ^{b,1}	0,514 ± 0,01 ^{b,1}	<0,001
2,5 mg/mL	0,921 ± 0,03 ^{d,12}	0,814 ± 0,08 ^{cd,1}	0,879 ± 0,03 ^{de,12}	1,022 ± 0,06 ^{e,2}	0,011
1,25 mg/mL	1,195 ± 0,05 ^{e,2}	1,429 ± 0,08 ^{e,3}	1,015 ± 0,08 ^{e,1}	0,971 ± 0,05 ^{e,1}	<0,001
0,63 mg/mL	0,938 ± 0,04 ^{d,12}	0,989 ± 0,16 ^{d,2}	0,794 ± 0,08 ^{cd,12}	0,719 ± 0,05 ^{d,1}	0,029
0,31 mg/mL	0,975 ± 0,03 ^{d,2}	0,660 ± 0,03 ^{bc,1}	0,673 ± 0,08 ^{bc,1}	0,661 ± 0,02 ^{cd,1}	<0,001
0,16 mg/mL	0,580 ± 0,06 ^c	0,649 ± 0,05 ^{bc}	0,648 ± 0,03 ^{bc}	0,649 ± 0,02 ^{cd}	0,210
0,08 mg/mL	0,233 ± 0,03 ^{b,1}	0,619 ± 0,01 ^{bc,2}	0,634 ± 0,07 ^{b,2}	0,581 ± 0,03 ^{bc,2}	<0,001
Controle Positivo	0,020 ± 0,01 ^a	0,020 ± 0,01 ^a	0,020 ± 0,01 ^a	0,020 ± 0,01 ^a	1,000
Controle Negativo	0,530 ± 0,04 ^c	0,530 ± 0,04 ^b	0,530 ± 0,04 ^b	0,530 ± 0,04 ^b	1,000
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Fonte: A Autora (2020).

Nota: a,b,c,d,e Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (Comparação entre os filtrados) (P<0,05).

F.1: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com muita Luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.2: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com pouca luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.3: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com ausência de luz, 37°C e pH 6,0 em meio BD

F.4: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com ausência de luz, 27°C e pH 6,5 em meio BD

Controle Positivo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno + Antibiótico (Cloranfenicol 30 µg/mL)

Controle Negativo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno

CONCENTRAÇÕES (mg/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CBAM 0665				p
	F1	F2	F3	F4	
	-----Médias (Absorbâncias) ± DP-----				
5,0 mg/mL	1,419 ± 0,03 ^{f,3}	1,307 ± 0,02 ^{e,2}	1,334 ± 0,01 ^{g,23}	1,050 ± 0,06 ^{d,1}	<0,001
2,5 mg/mL	1,416 ± 0,02 ^{f,3}	1,224 ± 0,06 ^{e,2}	1,247 ± 0,01 ^{fg,2}	0,992 ± 0,02 ^{d,1}	<0,001
1,25 mg/mL	1,032 ± 0,06 ^{e,12}	1,200 ± 0,02 ^{de,3}	1,149 ± 0,08 ^{ef,23}	0,983 ± 0,06 ^{d,1}	0,007
0,63 mg/mL	0,858 ± 0,07 ^{de,12}	1,017 ± 0,10 ^{d,23}	1,111 ± 0,04 ^{e,3}	0,805 ± 0,04 ^{c,1}	0,002
0,31 mg/mL	0,601 ± 0,35 ^{cd}	0,754 ± 0,08 ^c	0,938 ± 0,04 ^d	0,683 ± 0,06 ^c	0,216
0,16 mg/mL	0,324 ± 0,12 ^{abc,1}	0,604 ± 0,10 ^{c,2}	0,828 ± 0,02 ^{d,3}	0,531 ± 0,06 ^{b,12}	0,001
0,08 mg/mL	0,101 ± 0,06 ^{ab,1}	0,578 ± 0,09 ^{bc,2}	0,578 ± 0,06 ^{c,2}	0,496 ± 0,03 ^{b,2}	<0,001
Controle Positivo	0,00 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,01 ^a	1,000
Controle Negativo	0,408 ± 0,03 ^{bc}	0,408 ± 0,03 ^b	0,408 ± 0,03 ^b	0,408 ± 0,03 ^b	1,000
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Fonte: A Autora (2020).

Nota: a,b,c,d,e,f,g Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (Comparação entre os filtrados) (P<0,05).

F.1: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com muita Luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.2: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com pouca luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.3: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com ausência de luz, 37°C e pH 6,0 em meio BD

F.4: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com ausência de luz, 27°C e pH 6,5 em meio BD

Controle Positivo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno + Antibiótico (Cloranfenicol 30 µg/mL)

Controle Negativo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno

CONCENTRAÇÕES (mg/mL)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CBAM 0672				p
	F1	F2	F3	F4	
	-----Médias (Absorbâncias) ± DP-----				
5,0 mg/mL	0,926 ± 0,03 ^e	0,944 ± 0,02 ^e	0,833 ± 0,10 ^{de}	0,886 ± 0,03 ^f	0,146
2,5 mg/mL	0,905 ± 0,02 ^{e,12}	0,929 ± 0,00 ^{e,2}	0,948 ± 0,01 ^{e,2}	0,852 ± 0,03 ^{f,1}	0,003
1,25 mg/mL	0,864 ± 0,01 ^{e,3}	0,711 ± 0,02 ^{d,1}	0,939 ± 0,02 ^{e,4}	0,781 ± 0,04 ^{e,2}	<0,001
0,63 mg/mL	0,742 ± 0,01 ^{d,2}	0,688 ± 0,01 ^{d,1}	0,821 ± 0,03 ^{d,3}	0,706 ± 0,02 ^{d,12}	<0,001
0,31 mg/mL	0,513 ± 0,08 ^c	0,547 ± 0,03 ^c	0,563 ± 0,01 ^c	0,598 ± 0,00 ^c	0,173
0,16 mg/mL	0,365 ± 0,03 ^{b,1}	0,550 ± 0,04 ^{c,23}	0,482 ± 0,04 ^{bc,2}	0,614 ± 0,01 ^{c,3}	<0,001
0,08 mg/mL	0,309 ± 0,08 ^{b,1}	0,521 ± 0,02 ^{c,23}	0,412 ± 0,03 ^{b,12}	0,575 ± 0,01 ^{c,3}	<0,001
Controle Positivo	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,000
Controle Negativo	0,415 ± 0,01 ^{bc}	0,415 ± 0,01 ^b	0,415 ± 0,01 ^b	0,415 ± 0,01 ^b	1,000
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Fonte: A Autora (2020).

Nota: ^{a,b,c,d,e,f} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (comparação entre os tratamentos); ^{1,2,3,4} Números iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (Comparação entre os filtrados) (P<0,05).

F.1: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com muita Luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.2: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com pouca luz, 27°C e pH 6,0 em meio BD

F.3: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com ausência de luz, 37°C e pH 6,0 em meio BD

F.4: Filtrado (Extrato Bruto) do *Trichoderma virens* (CFAM 1144) cultivado com ausência de luz, 27°C e pH 6,5 em meio BD

Controle Positivo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno + Antibiótico (Cloranfenicol 30 µg/mL)

Controle Negativo: Caldo Mueller-Hinton + Patógeno