

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GLAUCIA RAYANE PIMENTEL MELO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Trichoderma* spp. DE ORIGEM AMAZÔNICA  
CONTRA FUNGOS E BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

MANAUS-AM  
2021

GLAUCIA RAYANE PIMENTEL MELO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Trichoderma* spp. DE ORIGEM AMAZÔNICA  
CONTRA FUNGOS E BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, área de Concentração: Saúde

Orientador: Dr. Luiz Antonio de Oliveira

MANAUS-AM  
2021

## Ficha Catalográfica

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

M528a	<p>Melo, Glaucia Rayane Pimentel</p> <p>Atividade antimicrobiana de <i>Trichoderma</i> spp. de origem amazônica contra fungos e bactérias de importância médica / Glaucia Rayane Pimentel Melo . 2021 84 f.: 31 cm.</p> <p>Orientador: Luiz Antonio de Oliveira Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Resistência antimicrobiana. 2. Metabólitos bioativos. 3. Antibiose. 4. Produtos naturais. 5. Amazônia. I. Oliveira, Luiz Antonio de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

GLAUCIA RAYANE PIMENTEL MELO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Trichoderma* spp. DE ORIGEM AMAZÔNICA  
CONTRA FUNGOS E BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira, Presidente  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, Membro  
Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia

À minha avó-mãe **Júlia Melo** (*in memoriam*)  
por todo amor e carinho dedicados à minha  
criação e ao meu amado filho, **Arthur Melo**,  
minha fonte de inspiração e amor  
incondicional! ♥

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus por ter me dado força, sabedoria, discernimento e principalmente por ter colocado pessoas incríveis na minha vida, as quais foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao meu querido esposo, Cartergiane Batista, por todo apoio, carinho e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao meu filho, Arthur Melo, que mesmo tão pequeno já me ensinou tanto nesta vida. É tudo por você e para você!

Ao meu orientador, Dr. Luiz Antônio de Oliveira, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, por ter acreditado em mim, no meu trabalho e principalmente por estar sempre disposto a me ajudar durante a realização desta pesquisa.

À Nathasha Fernandes por todo apoio, companheirismo, incentivo e pelas melhores conversas, aprendi muito com você.

À Dra. Janaína Rodrigues por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela parceria, pelos momentos de descontração e pelo nosso café de todo dia.

À Nadionada Menezes por todo apoio, incentivo e por estar sempre disposta a nos ajudar.

À Thaíssa Cunha pela parceria, apoio e principalmente por todo auxílio na realização dos trabalhosos experimentos.

À Mirna Miyamoto, ao Francisco Wesen e a toda a equipe do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia por todo apoio ao longo desses dois anos.

À Dra. Maria Tereza do Laboratório de produtos naturais do INPA, por me auxiliar na obtenção dos extratos e por estar sempre disposta a tirar minhas dúvidas. À Dra. Cecília

Verônica e ao Dr. Adrian Pohlit por disponibilizarem seus respectivos laboratórios para a obtenção dos extratos metabólicos.

À Ana Karoline Alves, Brenda Paula e Neidilê Munhoz do Laboratório Temático de Química e Produtos Naturais - INPA pela ajuda na realização dos testes de toxicidade. Ao Dr. Carlos Cleomir por gentilmente disponibilizar o laboratório para a realização desses experimentos.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia e a Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade e por todo conhecimento adquirido durante o curso.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, por ceder os laboratórios e equipamentos necessários para realização deste trabalho.

À FAPEAM pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

*Quando a dificuldade surgir e der vontade de desistir, tenha paciência e muita persistência.  
Continue a nadar...*

*Talita Rodrigues*

## RESUMO

A resistência antimicrobiana é um problema mundial de saúde pública, uma vez que várias espécies de microrganismos patogênicos ou oportunistas têm se tornado resistentes a diversos fármacos disponíveis no mercado, isto ocorre dentre outros fatores, pelo uso extensivo e indiscriminado de antibióticos e antifúngicos. As doenças infecciosas, estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade nos homens e nos animais, por isso a busca por novos fármacos de origem natural para tratamentos mais eficientes, menos tóxicos e com amplo espectro de ação antimicrobiana têm ganhado cada vez mais espaço na pesquisa. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de atividade antimicrobiana de linhagens de *Trichoderma* da região Amazônica contra bactérias e fungos de interesse médico. Para isto, o potencial antimicrobiano das linhagens selecionadas foi inicialmente avaliado em meio sólido pelo método do bloco de gelose contra seis bactérias, uma levedura e um fungo filamentoso. Posteriormente, foram selecionadas três linhagens de *Trichoderma* que apresentaram atividade antimicrobiana e foram cultivadas em dois meios líquidos: Batata-dextrose modificado com 2% de extrato de levedura (BD) e Farelo de trigo (FT) para obtenção dos extratos metabólitos com solvente Acetato de etila. Após o cultivo e obtenção dos extratos foram avaliadas a concentração mínima inibitória (CMI), a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos obtidos. Em seguida, realizou-se o teste de toxicidade em náuplios de *Artemia salina*. Todas as linhagens de *Trichoderma* avaliadas no bloco de gelose apresentaram inibição a pelo menos uma das seis bactérias testadas com diferentes tamanhos de halos de inibição. Da mesma forma, todas as linhagens apresentaram atividade contra a levedura, no entanto nenhuma foi capaz de inibir o fungo filamentoso. A CMI e a CBM dos extratos variaram de 0,03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $> 2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , no entanto a CFM encontrada foi de 1,00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Nos testes de toxicidade dos extratos de *Trichoderma* não foram observadas atividades tóxicas contra os náuplios de *Artemia salina* nas concentrações avaliadas. Diante dos resultados apresentados, observou-se que as linhagens de *Trichoderma* avaliadas neste trabalho são promissoras, pois apresentam atividade antimicrobiana eficientes contra os microrganismos testados.

**Palavras-chave:** Resistência antimicrobiana; Metabólitos bioativos; Antibiose; Produtos naturais, Amazônia.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a worldwide public health problem, since several species of pathogenic or opportunistic microorganisms have become resistant to several drugs available on the market, this occurs among other factors, due to the extensive and indiscriminate use of antibiotics and antifungals. Infectious diseases are among the main causes of morbidity and mortality in men and animals, so the search for new drugs of natural origin for more efficient treatments, less toxic and with a broad spectrum of antimicrobial action has gained more and more space in the search. Given this, the objective of this work was to evaluate the potential of antimicrobial activity of *Trichoderma* strains from the Amazon region against bacteria and fungi of medical interest. For this, the antimicrobial potential of the selected strains was initially evaluated as a solid medium by the agar block method against six bacteria, a yeast and a filamentous fungus. Subsequently, three strains of *Trichoderma* were selected that showed antimicrobial activity and were grown in two liquid media: Potato-dextrose modified with 2% yeast extract (BD) and Wheat bran (FT) to obtain metabolite extracts with solvent Acetate of ethyl. After cultivating and obtaining the extracts, the minimum inhibitory concentration (CIM), the minimum bactericidal concentration (CBM) and the minimum fungicidal concentration (CFM) of the obtained extracts were evaluated. Then, the toxicity test was performed on *Artemia salina* nauplii. All *Trichoderma* strains evaluated in the agar block showed inhibition of at least one of the six bacteria tested with different sizes of inhibition halos. Likewise, all strains showed activity against yeast, however none was able to inhibit the filamentous fungus. The CMI and CBM of the extracts ranged from 0.03  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  to  $> 2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , however the CFM found was 1.00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . In the toxicity tests of *Trichoderma* extracts, no toxic activities were observed against *Artemia salina* nauplii in the evaluated concentrations. In view of the results presented, it was observed that the *Trichoderma* strains evaluated in this work are promising, as they present efficient antimicrobial activity against the tested microorganisms.

Keywords: Antimicrobial resistance; Bioactive metabolites; Antibiosis; Natural products, Amazon.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Morfologia de <i>Trichoderma</i> spp. (adaptado de Rifai, 1996). B) Fotomicrografia de <i>Trichoderma harzianum</i> fiálides (adaptado de Samuels et al., 2002) .....	20
Figura 2 - Simplificação do ciclo de vida assexual de <i>Trichoderma</i> .....	21
Figura 3 - Esquema da metodologia utilizada no teste do bloco de gelose.....	39
Figura 4 - Fluxograma representando a obtenção dos extratos metabólicos de <i>Trichoderma</i> spp. após o cultivo submerso nos meios BD e FT.....	43
Figura 5 - Método de inoculação utilizado para determinação da concentração mínima inibitória - CMI dos extatos de <i>Trichodema</i> spp. ....	45
Figura 6 - Método de inoculação utilizado para determinar a Concentração letal média - CL50 dos extratos de <i>Trichodema</i> spp. contra <i>Artemia salina</i> .....	47
Figura 7 - Diferentes tamanhos dos halos de inibição de <i>Trichoderma</i> spp., observados no teste do bloco de gelose. A: <i>Trichoderma</i> sp. (CFAM 0837), <i>T. harzianum</i> (CFAM 1172) e <i>T. virens</i> (CFAM 1376 e CFAM 1379) testados contra <i>Staphylococcus aureus</i> (CBAM 0629). B: <i>Trichoderma</i> sp.....	50
Figura 8 - Diferentes tamanhos de halos de inibição de <i>Trichoderma</i> spp. observados no teste do bloco de gelose de <i>Trichoderma</i> sp. (CFAM 0837), <i>T. harzianum</i> (CFAM 1172) e <i>T. virens</i> (CFAM 1376 e CFAM 1379) testados contra <i>C. albicans</i> (CBAM 1186). No centro da placa o controle positivo (C+) com Itraconazol e abaixo o controle negativo (C-) apenas com o bloco de ágar .....	54
Figura 9 - Grau de sensibilidade dos microrganismos testados contra as linhagens de <i>Trichoderma</i> . Ausência sensibilidade: microrganismo que na leitura do teste do bloco de gelose não apresentaram halos de inibição na superfície da placa de ágar; Baixa sensibilidade: halos com até 12 mm; Média sensibilidade: halos no intervalo de 13 até 29 mm ; Alta sensibilidade: halos de inibição a partir de 30 mm.....	55
Figura 10 - Extrato bruto das linhagens de <i>Trichoderma</i> obtidos com acetato de etila .....	56
Figura 11 - Concentração mínima inibitória dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>S. aureus</i> (CBAM 0629). CMI dos extratos: 235 BE (colunas 1-4), 235 FE (5-8) e 767 BD (9-12). Linha H = controles positivo e negativo.....	59
Figura 12 - Concentração bactericida mínima dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. (767 FTE e 1172 BDLE) contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> (CBAM 0614).....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de <i>Trichoderma</i> selecionadas para a avaliação da atividade antimicrobiana .....	36
Tabela 2 - Formulação do meio BDA .....	36
Tabela 3 - Microrganismos selecionados para a realização dos testes antimicrobianos .....	37
Tabela 4 - Formulação do meio SAB .....	37
Tabela 5 - Interpretação dos resultados das médias dos halos de inibição do teste do bloco de gelose.....	39
Tabela 6 - Formulação do meio BD modificado com a adição do extrato de levedura .....	40
Tabela 7 - Formulação do meio FT* .....	40
Tabela 8 - Condições utilizadas no cultivo submerso das três linhagens de <i>Trichoderma</i> selecionadas para a obtenção dos extratos metabólicos .....	40
Tabela 9 - Esquema utilizado para o preenchimento das microplacas para o teste da concentração mínima inibitória .....	44
Tabela 10 - Toxicidade dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. de acordo com a mortalidades dos náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	50
Tabela 11- Bloco de gelose de <i>Trichoderma</i> spp. contra bactérias e fungos de importância médica (média das triplicatas dos halos de inibição - mm).....	49
Tabela 12 - Grau de sensibilidades dos microrganismos-teste às linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.....	52
Tabela 13 - Rendimentos dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos do cultivo submerso em 1 L nos meios BD e FT. Os extratos foram extraídos da biomassa micelial através do solvente Acetato de etila.....	57
Tabela 14 - Rendimentos dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos do cultivo submerso em 1 L nos meios BD e FT. Os extratos foram obtidos do caldo de cultivo através do solvente Acetato de etila.....	58
Tabela 15 - Identificação da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. contra as bactérias e a levedura.....	60
Tabela 16 - Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. contra as bactérias e a levedura.....	655
Tabela 17 - Toxicidade dos extratos obtidos do fungo <i>Trichoderma crassum</i> (CFAM 0235) com náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	65

Tabela 18 - Toxicidade dos extratos obtidos do fungo <i>Trichoderma</i> sp. (CFAM 0767) com náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	49
Tabela 19 - Toxicidade dos extratos obtidos do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> (CFAM 1172) com náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AT</b>	Altamente Tóxico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BD</b>	Batata-Dextrose
<b>BDA</b>	Batata-Dextrose-Ágar
<b>CBAM</b>	Coleção de Bactérias da Amazônia
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CFAM</b>	Coleção de Fungos da Amazônia
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CIGS</b>	Centro de Instrução de Guerra na Selva
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração Letal Média
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>CMH</b>	Caldo Mueller-Hinton
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> de Aderência Difusa
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EAEC</b>	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
<b>EHEC</b>	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>E. coli</i> Enteroinvasora
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
<b>ETEC</b>	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
<b>FT</b>	Farelo de Trigo
<b>HAIs</b>	Infecções Oportunistas Associadas aos Cuidados de Saúde
<b>IAC</b>	Infecções Adquiridas na Comunidade
<b>IPCSL</b>	Infecções Primária de Corrente Sanguínea Confirmada Laboratorialmente
<b>ISTH</b>	Subcomissão Internacional de Taxonomia de <i>Trichoderma</i> e <i>Hypocrea</i>
<b>LT</b>	Ligeiramente Tóxico
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
<b>NT</b>	Não Tóxico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PLL</b>	Partição-Líquido-Líquido

<b>RNAr</b>	Ácido Ribonucléico Ribossômico
<b>SAB</b>	Saboraud Ágar
<b>STEC</b>	<i>E. coli</i> Produtora de Toxina Shiga
<b>T</b>	Tóxico
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 Características gerais dos fungos.....	19
2.2 O gênero <i>Trichoderma</i> .....	20
2.3 A importância de <i>Trichoderma</i> .....	22
2.4 Doenças infecciosas de origem bacteriana e fúngica.....	23
2.4.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	24
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
2.4.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	26
2.4.4 <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.4.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	28
2.4.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
2.4.7 <i>Aspergillus niger</i> .....	30
2.4.8 <i>Candida albicans</i> .....	31
2.5 Resistência antimicrobiana .....	32
2.6 Metabólitos secundário e Atividade antimicrobiana de <i>Trichoderma</i> spp. ....	33
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 Geral .....	35
3.2 Específicos.....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 Microrganismos .....	36
4.1.1 Seleção, reativação e manutenção das culturas de <i>Trichoderma</i> ... ..	36
4.1.2 Seleção, reativação e manutenção das culturas de bactérias e fungos .....	36
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido .....	37
4.2.1 Cultivo dos microrganismos .....	38
4.2.1.1 <i>Trichoderma</i> .....	38
4.2.1.2 Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido e padronização do inóculo .....	38
4.2.1.3 Cultivo da levedura, das bactérias e padronização dos inóculos .....	38
4.2.2 Bloco de gelose .....	39
4.3 Cultivo de <i>Trichoderma</i> spp. em meio líquido.....	40
4.4 Obtenção dos extratos metabólicos de <i>Trichoderma</i> spp. ....	41

4.4.1 Separação da biomassa micelial do meio de cultura fermentado .....	41
4.4.2 Extração química dos metabólitos intracelulares .....	41
4.4.3 Extração química dos metabólitos extracelulares.....	42
4.5 Concentração Mínima Inibitória-CMI .....	44
4.5.1 CMI em microplacas de 96 poços .....	44
4.6 Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) .....	46
4.7 Toxicidade com larvas de <i>Artemia salina</i> .....	46
4.7.1 Cultivo de <i>Artemia salina</i> .....	46
4.7.2 Preparo das soluções estoque dos extratos e do controle positivo .....	46
4.7.3 Bioensaio .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1 Bloco de gelose por difusão em ágar.....	49
5.2 Obtenção dos extratos metabólicos de <i>Trichoderma</i> .....	56
5.3 Concentração Mínima Inibitória - CMI.....	59
5.4 Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima.....	62
5.5 Toxicidade dos extratos de <i>Trichoderma</i> spp. com náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	66
<b>666 CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm sendo explorados pela humanidade para fins terapêuticos, sendo as plantas a fonte natural de substâncias biotivas mais utilizada na medicina popular (STROBEL et al, 2004). No entanto, diversos compostos naturais biotivos são produzidos pelo metabolismo celular dos demais seres vivos, como os animais e os microrganismos (GUO, 2017).

O interesse por metabólitos originados de microrganismos só ocorreu em 1929, após Fleming descobrir a penicilina, substância com ação antibacteriana isolada de *Penicillium notatum*. Esta descoberta contribuiu para o tratamento de infecções bacterianas e para a busca por metabólitos bioativos provenientes de microrganismos (PUPO et al, 2007). Com isso houve a descrição de diversos fármacos e uma ampla diversidade de indicações terapêuticas, como a cefalosporina, o ácido micofenólico, as estatinas e outros, que ampliaram o interesse na pesquisa para a descoberta de novas substâncias (MOREIRA, 2013).

Dentre os microrganismos, *Trichoderma* spp. é eficiente contra alguns fungos e bactérias que causam doenças no homem. Isso ocorre por conta da grande quantidade de metabólitos secundários produzidos por eles, como: ácido harziânico, alameticinas, antraquinonas, azafilonas, daucanas, harzialactonas, bisorbicillinoídes, butenolides, tricholina, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, pironas, tricotecenos, isocianatos, trichosetina, viridina, peptaiboles, entre outros (REINO et al, 2008; MOHIDDIN et al, 2010; MOREIRA, 2013). A maioria desses metabólitos tem ação antifúngica e antibacteriana, podendo ser ou não voláteis, os quais apresentam um amplo espectro de ação antimicrobiana (PAPHITOU, 2013).

Estudos indicam que espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos com ação antimicrobiana contra alguns patógenos humano como *Candida albicans*, *C. tropicali*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus* e *Cladosporium shaerospermum*, inclusive contra bactérias associadas a infecções nosocomiais como *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (TIJERINO et al, 2011; MOREIRA, 2013; SADYKOVA et al, 2015).

As doenças infecciosas, principalmente as bacterianas estão entre as maiores causadoras de morbidade e mortalidade no homem, tornando-se um dos maiores desafios da medicina desde a descoberta das bactérias no final do século XIX (DAVIES; DAVIES, 2010). Além da penicilina, outros antimicrobianos foram desenvolvidos visando o controle das doenças infecciosas. Entretanto, com o uso extensivo e inapropriado desses antibióticos, várias bactérias associadas a epidemias de doenças humanas evoluíram para formas

multirresistentes (SANTOS, 2007; SAGA; YAMAGUCHI, 2009; GUMBO, 2012; PAPHITOU, 2013).

A resistência microbiana a diversos fármacos e a falta de alternativas terapêuticas eficazes para o tratamento das infecções são fatores preocupantes e um dos maiores desafios da saúde pública mundial (PAPHITOU, 2013). Por isso, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de isolar e purificar substâncias de origem natural, com atividade antimicrobiana mais efetiva, menos tóxica e com diferentes mecanismos de ação (SAGA; YAMAGUCHI, 2009; DAVIES; DAVIES, 2010; PAPHITOU, 2013).

Neste sentido, estudos que visem a descoberta de novas substâncias bioativas provenientes de fungos amazônicos se mostram bastante promissores, pois a biodiversidade microbiológica da região é grande e pouco explorada, o que aumenta a probabilidade da descoberta de novos compostos de interesse biotecnológico. Assim, o intuito desta pesquisa foi avaliar o potencial antimicrobiano de *Trichoderma* spp. contra bactérias e fungos de interesse clínico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS

O Reino Fungi foi um dos cinco descrito por Whittaker em 1969 e atualmente representa o segundo maior em número de espécies, ficando atrás apenas do reino animal, especificamente a classe insecta (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Estima-se que existam, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies de fungos, habitando de forma harmônica ou não, todos os ecossistemas do planeta (ABREU et al, 2015). Por isso, são considerados cosmopolitas, podendo ser encontrados em todos os ambientes como solo, água, ar, além de animais e plantas, vivendo como parasitas ou simbioses mutualistas (SILVA; COELHO, 2006).

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos com nutrição absorptiva por osmose ou difusão, podendo ser unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (filamentosos) e apresentam características micro ou macroscópicas (SILVA; COELHO, 2006). Quanto à sua reprodução, os fungos são classificados de três formas: Teleomorfo, quando a reprodução é de forma sexuada, com a formação de esporos; Anamorfo, quando se reproduzem assexuadamente, através da produção de conídios ou Holomorfo quando se reproduzem de ambas as formas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Os fungos, geralmente, estão associados a doenças em seres humanos, plantas e animais, assim como a degradação de produtos orgânicos e na deterioração dos não orgânicos, gerando diversos prejuízos econômicos e ambientais (ALEXOPOULOS et al, 1996). Estima-se que das mais de 100 mil espécies de fungos conhecidas, somente 200 podem causar doenças ao homem e aos animais (TORTORA et al, 2012). No entanto, apresentam grande importância ecológica, por serem eficientes decompositores da matéria orgânica viva ou morta, realizando assim, a ciclagem de nutrientes no ambiente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Várias espécies de macrofungos como o *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *A. brasiliensis* e *Lentinula edodes* são utilizados como alimentos *in natura* (LARGETEAU et al, 2011; CHIAVEGATTI et al, 2018; PAZZA et al, 2019). E outras como os filamentosos e leveduriformes são utilizados em processos fermentativos para a produção de alimentos e bebidas (TORTORA et al, 2012). Além disso, são usados para produzir diversas enzimas de interesse econômico, que auxiliam na produção de detergentes, vitaminas, antibióticos,

biocombustíveis, dentre outros produtos (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; ABREU et al, 2015).

## 2.2 O GÊNERO *Trichoderma*

*Trichoderma* foi descrito pela primeira vez por Peerson em 1794, que inicialmente o classificou como *T. viride* Peerson (SAMUELS, 2006). No entanto, em 1969 Rifai realizou a primeira revisão do gênero agregando nove espécies: *T. glaucum* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. polysporum* Link, *T. koningii* Lieckfeld, *T. aureoviride* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Bissett e *T. viride* Persoon as quais foram diferenciadas pela ramificação dos conidióforos e a morfologia dos conídios (RIFAI, 1969; SAMUELS, 2006).

Os conidióforos são hifas especializadas, férteis, simples ou complexas, do sistema vegetativo, que originam em sua extremidade as células conidiogênicas (fiálides). E estas, por sua vez, formam os conídios, que são estruturas de disseminação das espécies, ou seja, os esporos dos fungos anamorfos (FIGURA 1) (BONONI; GRANDI, 1999; NEUFELD, 1999).

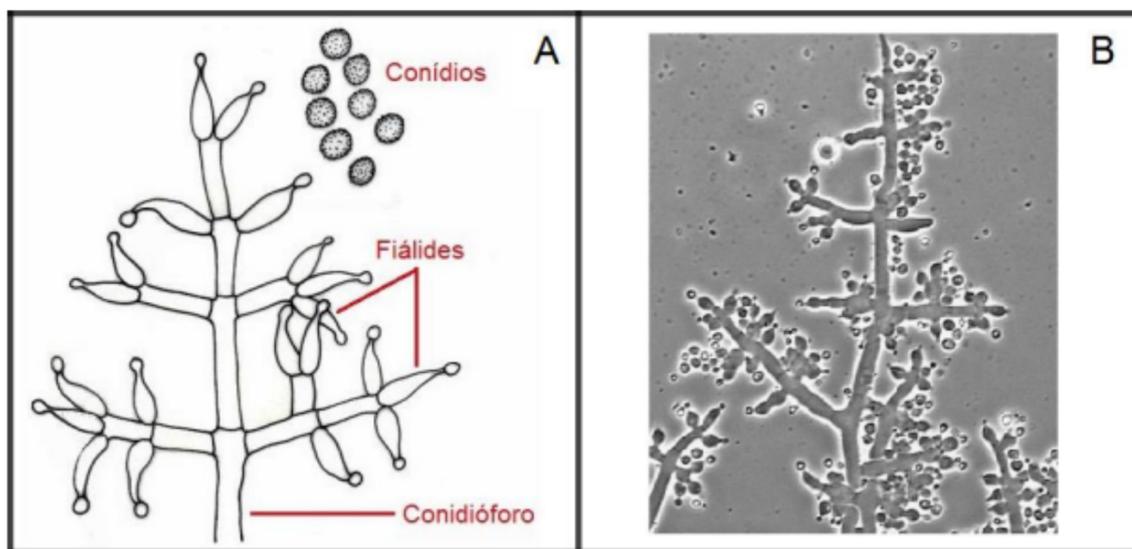


Figura 1- A) Morfologia de *Trichoderma* sp. (adaptado de Rifai, 1996). B) Fotomicrografia de *T. harzianum* fiálides (adaptado de Samuels et al, 2002)

Fonte: Feitosa (2016).

Os fungos anamorfos, também chamados de mitospóricos, imperfeitos ou conidiais, apresentam como característica principal a reprodução assexuada através da produção

contínua e abundante de conídios (FIGURA 2) (KUMAR, 2013; SRIVASTAVA et al, 2014).

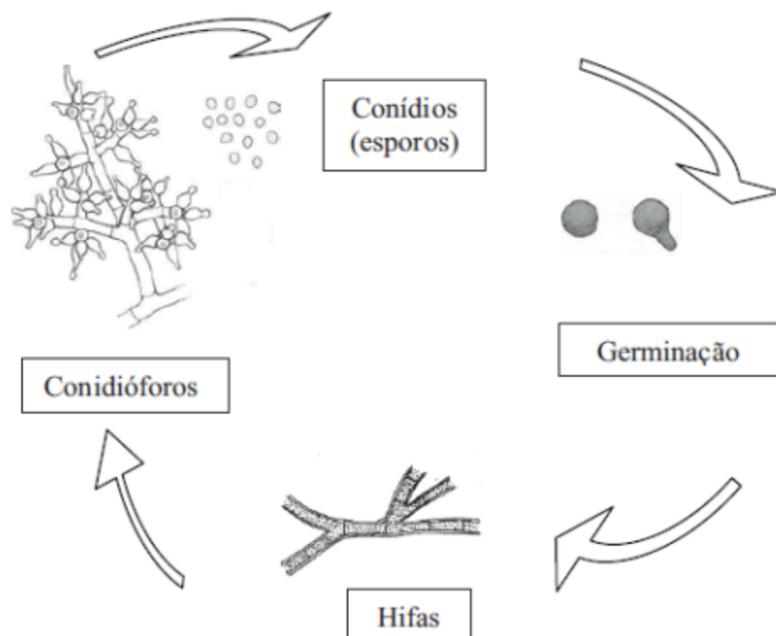


Figura 2 - Simplificação do ciclo de vida assexual de *Trichoderma*  
Fonte: Machado et al, (2012).

Dentre os anamorfos, *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae (HARMAN et al, 2004b; BRITO *et al*, 2014). São fungos de vida livre, com ampla distribuição no ambiente, principalmente em regiões de clima temperado e tropical; comumente são encontrados em solos, raízes, habitats naturais ricos em matéria orgânica vegetal, associados à madeira em decomposição ou parasitando outros fungos. Além disso, podem viver endofitamente sem causar danos aparentes ao hospedeiro e raramente causam doenças em plantas vivas (HARMAN et al., 2004b; MUKHERJEE et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2014).

O gênero *Trichoderma* (anamorfo) é descrito como a fase assexual do gênero *Hypocrea* (teleomorfo) que por algum motivo perdeu a capacidade de se reproduzir sexuadamente, entretanto muitas cepas de *Trichoderma* não têm o estágio sexual conhecido até o momento (HARMAN et al., 2004b).

Devido ao pleomorfismo, há uma grande dificuldade em definir a nomenclatura desses fungos. Até 2015, a Subcomissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH) listava 256 espécies identificadas (<http://www.isth.info/trichoderma/>). Porém, com o auxílio de novas metodologias, os taxonomistas estão revisando a nomenclatura

desse grupo, com propostas de novas espécies (HARMAM et al, 2004b; SRIVASTAVA et al, 2014).

### 2.3 A IMPORTÂNCIA DE *Trichoderma*

Este gênero apresenta grande importância ecológica e econômica, principalmente para a agricultura, por ser um eficiente antagonista contra diferentes fitopatógenos de diversas plantas como: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. ampelinum*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *F. semitectum*, *Rhizopus* sp., *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*, dentre outros (ISAIAS et al, 2014; LEELAVATHI et al, 2014; SHENTU et al, 2014).

A interação entre o antagonista, o patógeno e o hospedeiro pode favorecer o biocontrole, através de diferentes mecanismos de ação, simultâneos ou não, tais como: competição por espaço e nutrientes, antibiose, indução a resistência das plantas ao patógeno ou micoparasitismo onde ocorre uma cascata de ações que vai desde o reconhecimento do patógeno até a expressão do antifúngico (MUKHERJEE et al, 2012; KUMAR, 2013; GELLEN et al, 2014; WOO et al, 2014).

Em vista deste potencial antagônico e micoparasitário, algumas linhagens de *Trichoderma* reduzem a gravidade das doenças de plantas, através da inibição dos agentes fitopatogênicos de raízes e solo (VITERBO; HORWITZ, 2010). Isto ocorre devido à ação conjunta de enzimas que degradam a parede celular e alguns metabólitos secundários sintetizados pelo fungo (LORITO et al, 1996)

Algumas espécies são bioindutoras de crescimento vegetal, uma vez que auxiliam na germinação de sementes e no crescimento das plantas através da produção de fitohormônios e da solubilização de nutrientes do solo (OLIVEIRA et al, 2012; CHAGAS et al, 2016).

*Trichoderma* é considerado inofensivo ao homem e ao meio ambiente, no entanto, em alguns casos, algumas espécies oportunistas podem causar doenças em humanos imunosuprimidos (HARMAM et al, 2004b; LOUZADA et al, 2009; MUKHERJEE et al., 2011; PINTO et al, 2014; SRIVASTAVA et al., 2014). As espécies patogênicas oportunistas com maior incidência são: *Hypocrea orientalis*, *T. citrinoviride* Bissett, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* (DRUZHININA et al, 2008).

Por outro lado, *Trichoderma* sp. apresenta atividade antifúngica contra patógenos que causam doenças nos seres humanos, como as espécies: *A. fumigatus*, *A. terreus*, *C.*

*albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. shaerospermum* (TIJERINO et al, 2011; MOREIRA, 2013; SADYKOVA et al, 2015).

*Trichoderma* é um dos fungos filamentosos mais estudados mundialmente, por apresentarem alto potencial de aplicabilidade em diversos setores industriais e processos biotecnológicos (PINTO et al, 2014). Visto que sintetizam diversas enzimas hidrolíticas como as celulases, quinases, glucanases, proteases dentre outras, com grande importância industrial (MUKHERJEE et al, 2013). Como também produzem exoglucanases, endoglucanases, celobiase e quitinase, enzimas, que agem na degradação e lise da parede celular de fungos patogênicos (BOMFIM et al, 2010).

#### **2.4 DOENÇAS INFECCIOSAS DE ORIGEM BACTERIANA E FÚNGICA**

As doenças infecciosas são causadas por parasitas como os helmintos e protozoários; por proteínas infectantes, os príons, ou por microrganismos como os vírus, fungos e bactérias (KONEMAN; CURY, 2010). Dentre estes destacam-se as infecções de origem bacterianas e fúngicas, que afetam milhões de pessoas em todo o mundo, ocasionando um problema mundial de saúde pública (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

As doenças geralmente ocorrem quando um microrganismo patogênico infecta um hospedeiro suscetível. Entretanto, microrganismos da microbiota normal também podem causar doenças oportunistas, isto pode acontecer quando o microrganismo está fora do seu habitat normal ou ainda quando há um desequilíbrio metabólico no hospedeiro. Este desequilíbrio geralmente ocorre quando a imunidade está baixa o que contribui para a colonização exarcebada de fungos e/ou bactérias oportunistas (NOGUEIRA; MIGUEL, 2010).

De maneira geral, as infecções podem ser consideradas de duas formas, de acordo com sua origem: 1) Infecção comunitária: ocorre quando o microrganismo patogênico já estava incubado antes da internação do paciente no hospital; 2) Infecção nosocomial ou hospitalar: a contaminação ocorre no ambiente hospitalar, neste caso o processo infeccioso se manifesta durante o período de internação ou logo após a alta (DAVID, 1998).

As infecções hospitalares são uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre os pacientes internados na UTI, uma vez que estes pacientes são submetidos a diversos processos invasivos por um longo período de tempo. Além disso, a alteração do sistema

imunológico destes pacientes é um fator decisivo que os tornam mais suscetíveis a invasão destes patógenos no seu organismo (DAVID, 1998; ANDRADE et al, 2015).

Nas últimas décadas o número de infecções oportunistas aumentou consideravelmente entre pacientes imunocomprometidos, isto pode está diretamente relacionado com a evolução nos tratamentos de várias doenças; desta forma o uso prolongado de antibióticos, antifúngicos, anti-neoplásicos, imunossopressores, assim como o transplante de órgão e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) afetam o sistema imunológico do paciente deixando-o mais suscetível a infecções invasivas severas podendo até evoluir para o óbito (SOUZA, 2006; LAI et al, 2008; ALANGADEN, 2011).

Dentre os microrganismos comumente associados a infecções em humanos estão as bactérias Gram-positivas: estafilococos, estreptococos e enterococos; além das Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e alguns bastonetes não fermentadores (FERNANDES, 2000). Entretanto, as infecções fúngicas destacam-se como a quarta maior causadoras de sepse entre pacientes internados na UTI, dentre os fungos os mais isolados neste ambiente como agente etiológico são as leveduras do gênero *Candida* (FERNANDES, 2000).

#### **2.4.1 *Bacillus cereus***

O grupo *Bacillus cereus* agrupa sete espécies de bactérias: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensi* e *B. cytotoxicus* (LECHNER et al, 1998; NAKAMURA, 1998; GUINEBRETIERE et al, 2013). Geneticamente, essas espécies são altamente similares, tanto que a hibridização DNA-DNA e a análise das sequências RNAr 16s e 23s não foram suficientes para separar claramente as espécies desse grupo (ASH et al, 1991; FRITZE, 2004).

*Bacillus cereus* são Gram-positivas, anaeróbicas facultativas e formadoras de endosporos resistentes a condições ambientais extremas como desidratação e altas temperaturas, o que resulta em uma ampla distribuição da espécie nos diversos ambiente como ar, solo, água e material animal e vegetal (GRIFFITHS; SCHRAFT, 2017).

A espécie *B. cereus* é considerada patogênica para o homem e outros animais, pois pode causar intoxicações alimentares e infecções oportunistas (HENDRIKSEN et al, 2006; LOGAN; DEVOS, 2009). É contaminante comum de alimentos e produtos alimentares

processados, como carnes, vegetais, arroz, farináceos, fórmulas infantis, produtos lácteos, dentre outros (CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011; CHAVES *et al.*, 2017).

Segundo Paiva (2009), *B. cereus* geralmente são encontrados nos alimentos em baixos níveis, menos de  $10^2$  UFC/g, os quais são considerados aceitáveis. No entanto, quando ocorre falhas na conservação dos alimentos, estes microrganismos se multiplicam significativamente com níveis acima de  $10^5$  UFC/g, causando doenças gastrointestinais como síndrome diarreica e síndrome emética (PAIVA, 2009; GRIFFITHS; SCHRAFT, 2017).

Além das doenças gastrointestinais, *B. cereus* também pode causar patologias oculares virulentas como conjuntivite, panoftalmite, ceratite, iridociclite e abscesso orbital; e ainda pode ocasionar infecções oportunistas no trato respiratório e infecções de feridas (BOTTONNE, 2010).

*Bacillus cereus* também está presente no ambiente hospitalar, principalmente em unidades de terapia intensiva, pois a utilização de dispositivos invasivos nos pacientes como: cateteres intravenosos e umbilicais, válvulas cardíacas, marca-passos e sondas urinárias contribuem para a formação de biofilmes que se aderem a esses dispositivos. A partir da formação do biofilme, as células bacterianas são liberadas periodicamente na corrente sanguínea, causando bacteremia (BOTTONNE, 2010).

#### **2.4.2 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, de forma esférica, não móvel, não formadora de esporos e coagulase-positiva (GNANAMANI *et al.*, 2017). É altamente adaptável podendo ser encontradas na pele, mucosas, glândulas da pele, solo, água e ar; além disso é resistente a dessecação, pois podem sobreviver em superfícies secas por um longo período e ainda são resistentes a altas concentrações de sal (BITRUS *et al.*, 2018).

Segundo Ratti e Sousa (2009), *S. aureus* é um comensal nasal que habita na microbiota humana em aproximadamente 20 a 40% dos adultos saudáveis. No entanto, este microrganismo oportunista é frequentemente encontrado em infecções de comunidade, sendo o agente etiológico de diversas infecções em humanos e animais causando grandes impactos na saúde pública (LUZZAGO *et al.*, 2014).

As doenças em humanos variam de infecções leves da pele e dos tecidos moles a endocardite com risco de vida, abscesso superficial cutâneo, intoxicação alimentar,

osteomielite crônica, pneumonia ou bacteremia, que estão associadas a morbidade e mortalidade significativas (SHAW et al, 2004). Já nos animais, *S. aureus* pode causar mastite em vacas, botriomicose em cavalos, dermatite em cães, septicemia e artrite em aves (ZUNITA et al, 2008; LUZZAGO et al, 2014).

*Staphylococcus aureus* foi reconhecido pela primeira vez como patógeno humano há mais de 130 anos, após ser isolado de abscessos supurativos. No entanto, em 1940 foram relatados o desenvolvimento de resistência de *S. aureus* à penicilina através da produção da penicilase, uma enzima hidrolisante (BASSET et al, 2011). Atualmente, estima-se que mais de 90% dos estafilococos isolados são produtores da penicilinase, ou seja, são resistentes à penicilina (CRAFT et al, 2019).

Posteriormente, a meticilina começou a ser utilizada como estratégia para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, entretanto após um ano de uso da droga, *S. aureus* também adquiriu resistência a meticilina, nesse período foram descritas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina - MRSA (PURRELLO et al, 2011). Desse modo, nos últimos anos, os MRSA evoluíram tornando-se resistentes a múltiplos fármacos, sendo reconhecido como o principal causador de infecções hospitalares (DAVIES; DAVIES, 2010).

### **2.4.3 *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota natural humana, são encontradas principalmente na pele e mucosas como as axilas, cabeça e narinas. Acredita-se que a colonização de *S. epidermidis* nestas regiões favorece a saúde do seu hospedeiro, uma vez que impede proliferação de outros microrganismos patogênicos mais virulentos (OTTO, 2009; CHESSA et al, 2015).

Por outro lado, *S. epidermidis* apresenta um grande potencial patogênico, uma vez que expressa vários fatores de virulência, sendo então descrito como um dos principais agentes infecciosos de doenças relacionadas assistência à saúde que envolvem dispositivos médicos, como cateteres, próteses, sondas, dentre outros, através da formação de biofilme (NANVAR et al., 2014; CHESSA et al., 2015).

Estudos demonstram que essas infecções e conseqüentemente a formação de biofilme nos dispositivos médicos são causadas por cepas presentes na pele do próprio paciente; ou ainda podem ser transmitidas através dos profissionais de saúde que manipulam os

dispositivos e acabam contaminando-o durante processo de inserção (OTTO, 2009; NANVAR et al, 2014; CHESSA et al, 2015).

Além das doenças relacionadas a dispositivos médicos, *S. epidermidis* também pode causar outras doenças como inflamação aguda ou crônica nos ossos (osteomielite), infecções de feridas, otite média, endoftalmite, meningite, infecções do trato urinário e pneumonia (ZIEBUHR et al, 2006; SOUSA, 2009). Estas doenças afetam principalmente pacientes imunocomprometidos, recém-nascidos e pacientes que permanecem internados por muito tempo (EIFF et al., 2001; EIFF et al., 2002; VUONG; OTTO, 2002).

#### **2.4.4 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastonete, anaeróbia facultativa, oxidase negativa e fermentadora de carboidratos. Faz parte da família Enterobacteriaceae, uma vez que coloniza o intestino dos seres humanos e animais, nas primeiras horas após o nascimento e geralmente habita de forma harmônica a microbiota intestinal do seu hospedeiro (BOPP et al, 1999; KUHNERT et al, 2000).

Normalmente, *E. coli* é mutualista, pois exerce uma relação benéfica com seus hospedeiros, uma vez que suprime a colonização de bactérias patogênicas e além disso, sintetiza diversas vitaminas em seu hospedeiro. No entanto, algumas cepas com genes de virulência ou mesmo as cepas comensais podem causar doenças em hospedeiros imunocomprometidos ou com a microbiota intestinal alterada, causando patologias como diarreias inflamatória e não inflamatória, síndrome hemolítico-urêmica, infecção urinária, meningite neonatal, pneumonia e até septicemia (NATARO; KAPER 1998; KAPER et al, 2004).

Segundo Liu et al, (2012), a diarreia é uma das maiores causas de morbidades e mortalidades em crianças menores de cinco anos; estima-se que aproximadamente 10,5% das mortes em crianças desta faixa etária em 2010 foram causadas por diarreia. No entanto, esta porcentagem pode ser ainda maior em países subdesenvolvidos onde não há saneamento básico adequado para as famílias, uma vez que a transmissão de *E. coli* ocorre de forma fecal-oral através da ingestão de água e alimentos contaminados (NATARO; KAPER 1998; FISCHER et al, 2012).

As cepas patogênicas de *E. coli*, podem ser classificadas como extraintestinais ou entéricas, os patótipos reconhecidos são *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli*

enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Esses são diferenciados através de marcadores genéticos de patogenicidade específicos (KAPER et al, 2004; MARKEY et al, 2013).

#### **2.4.5 *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbias facultativas, imóvel, com formato de bastonete e pertencente à família Enterobacteriaceae (ADEOLO et al, 2016). Estão presentes em diferentes habitats como: plantas, solo, esgoto, águas de superfícies; assim como em mucosa da nasofaringe e intestinal de humanos e animais podendo viver como comensal ou um potencial patógeno (KONEMAN et al, 2001; WYRES; HOLT, 2018).

*Klebsiella pneumoniae* foi descrita pela primeira vez como agente etiológico da pneumonia em 1882 por Carl Friedländer e desde então vem sendo isolada como um dos patógenos de infecções nosocomiais mais comuns do mundo e uma das principais bactérias causadoras de sepse em neonatais (ZAIDI, 2005; PENDLETON, 2013; OKOMO, 2019).

As infecções causadas por *K. pneumoniae*, geralmente são infecções oportunistas associadas aos cuidados de saúde (HAIs) em pacientes vulneráveis como é o caso dos recém-nascidos, idosos, pacientes imunocomprometidos ou aqueles que são portadores de dispositivos médicos. As patologias mais comuns são pneumonia, infecções de ferida, do trato urinário e bacteremia (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; WYRES et al, 2020). Além das infecções hospitalares, *K. pneumoniae* também pode causar infecções adquiridas na comunidade (IAC) graves, como endoftalmite, pneumonia, fascíte necrotizante, abscesso hepático e não hepático e meningite (RUSSO; MARR, 2019).

#### **2.4.6 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* pertence a família Pseudomonadacea, é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bacilos, aeróbia, não fermentadora de glicose, móvel, de vida livre, amplamente distribuída no ambiente, podendo ser encontrada em solo, plantas e água (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; PALLERONI, 2008).

É uma bactéria altamente adaptável, pois consegue sobreviver a grandes variações de temperatura e umidade, por isso é uma das bactérias que apresenta grande diversidade

ecológica, podendo ocupar os mais diversos nichos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; PALLERONI, 2008).

*Pseudomonas aeruginosa* é considerada uma bactéria oportunista que possui vários fatores de virulência que podem causar diversas doenças ao homem, no entanto as doenças afetam principalmente pacientes hospitalizados e pacientes com o sistema imunológico comprometido. Entretanto, raramente *P. aeruginosa* causa doenças em seres humanos saudáveis, estima-se que apenas 2 a 4% desses indivíduos foram infectados por essa bactéria (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; KHALIFA et al, 2011; GELLATLY; HANCOCK, 2013; ALHAZMI, 2015).

As doenças relacionadas a *P. aeruginosa* são infecções oculares, auditivas, cutâneas, urogenitais, pulmonares e bacteremias (GELLATLY; HANCOCK, 2013; ALHAZMI, 2015). A disseminação e contaminação por essa bactéria em ambiente hospitalar ocorre através do uso de aparelhos médicos tais como: nebulizadores, cateteres, endoscópios e equipamentos de diálise (VALLET, 2003; ALHAZMI, 2015). Além disso, os objetos pessoais dos profissionais da saúde que estão em contato direto com o paciente, podem ser potenciais reservatórios e vetores de *P. aeruginosa* (TESS et al, 1993; MCNEIL et al, 2001).

Segundo dados publicados pela ANVISA (2015), *P. aeruginosa* é um dos patógenos mais isolados em ambientes hospitalares no mundo; neste contexto é descrito como segundo patógenos mais frequentemente isolado em pacientes com pneumonia associado à ventilação mecânica nos Estados Unidos.

No Brasil, *P. aeruginosa* ocupa o 5º lugar do ranking dos microrganismos mais isolados em pacientes internados na UTI. Com destaque para a região Norte do Brasil, onde *P. aeruginosa* é relatada como o segundo patógeno mais notificados como agentes etiológicos de infecções primária de corrente sanguínea confirmada laboratorialmente - IPCSL; no entanto, estima-se que o número de pacientes infectados seja ainda maior, uma vez que os casos nesta região são subnotificados ou as informações são escassas quando comparadas ao restante dos estados brasileiros (ANVISA, 2015).

#### **2.4.7 *Aspergillus niger***

*Aspergillus niger* foi descrito pela primeira vez por Van Tieghem em 1867, é um fungo filamentoso que se reproduz assexuadamente (anamorfo) através da produção contínua e dispersão cosmopolita de conídios. São fungos de vida livre que podem ser encontrados

principalmente no solo e decompondo a matéria orgânica vegetal viva ou morta (SCHUSTER et al, 2002; MARTINS et al, 2005; BENNETT, 2010).

*Aspergillus niger* é amplamente utilizado nas indústrias de fermentação para produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico que é muito utilizado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias para a produção de medicamentos e alimentos, respectivamente (PEL et al, 2007). Além disso, *A. niger* também produz diversas enzimas como as amilases, lipases, celulasas, xilanases e proteases, amplamente utilizadas nas indústrias em processos biotecnológicos (BASU et al., 2007; PEL et al, 2007).

Por outro lado, *A. niger* está entre as espécies do gênero *Aspergillus* descritas como causadoras da aspergilose; uma infecção oportunista que afeta o sistema respiratório dos seres humanos e animais, podendo se disseminar para outros órgãos e em caso mais graves pode levar o paciente a morte (STEVENS, 2001).

As infecções causadas por *A. niger*, ocorrem principalmente através da inalação dos conídios por indivíduos imunodeficientes; dessa forma as principais doenças relacionadas a este fungo são: aspergiloma, doença brônquica superficial, a alveolite alérgica extrínseca, doença broncopulmonar alérgica, sinusite, otite, endoftalmite e endocardite em valva protética (BARNES; MARR, 2006; LAI et al, 2008; O’GORMAN, 2011; BEISSWENGER et al, 2012).

#### **2.4.8 *Candida albicans***

*Candida albicans* é um fungo leveduriforme, diploide e dimórfico, normalmente habitam de forma comensal a microbiota da pele, cavidade oral e na mucosa dos tratos gastrointestinal e genitourinário dos seres humanos; podem ser adquiridas durante o parto na passagem do feto pelo canal vaginal da mãe. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio na relação agente-hospedeiro, esta levedura pode causar doenças, por isso são consideradas como patógenos oportunistas (OSTROSKY-ZEICHNER; PAPPAS, 2006; SANTOS et al, 2006).

Leveduras do gênero *Candida* são causadoras da candidíase, uma infecção oportunista que afeta a mucosas oral e/ou vaginal, podendo evoluir para a candidemia, uma infecção sistemicamente na corrente sanguínea que afeta outros órgãos. Estima-se que 50% das infecções totais de candidíase seja causada pela espécie *C. albicans*, seguido das espécies

não-albicans: *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. (CASTÓN-OSORIO; RIVERO; TORRES-CISNERO, 2008; WEINDL et al, 2010; ALANGADEN, 2011).

As infecções causadas por *Candida* spp. estão associadas a infecções nosocomiais, pois são as maiores causadoras de infecções fúngicas em ambiente hospitalar, gerando um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves ou pacientes em pós-operatório; dentre as espécies de *Candida*, observar-se que *C. albicans* é predominante nas infecções nas unidades hospitalares de pacientes queimados (BRASIL, 2004).

As apresentações clínicas das doenças mucocutânea por *Candida* spp., mais conhecida como candidíase oral, ocorrem de diferentes formas de acordo com a cronicidade da doença: candidíase pseudomembranosa aguda, candidíase atrófica crônica, ueilite angular, candidíase hiperplástica crônica e candidíase mucocutânea crônica (WEINDL et al, 2010).

A candidíase vulvovaginal foi descrita pela primeira vez por JS Wilkinson em 1949 como um processo infeccioso e/ou inflamatório da vulva e vagina, ocorre pelo menos uma vez na vida de 75% das mulheres (KIM; SUDBERY, 2011). Esta infecção tem como principal agente etiológico a *C. albicans* com 80 a 90% das descrições dos casos, o restante é causado por espécies de *Candida* não-albicans (ZIARRUSTA, 2002; HOLANDA et al, 2007; CORREA et al., 2009).

## 2.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A descoberta dos antibióticos foi um marco revolucionário no tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana, pois reduziu substancialmente o número de morbidade e mortalidade dos seres humanos e animais (PAPHITOU, 2013). Os antibióticos são medicamentos com ação bactericida ou bacteriostática que agem contra microrganismos patogênicos ao homem, animais e plantas (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; FARHA; BROWN, 2016).

Por outro lado, as bactérias são organismos altamente adaptativos ao ambiente, desse modo o mecanismo de resistência é uma consequência natural para a sobrevivência e perpetuação das espécies, mas o uso inadequado destes medicamentos tem acelerado drasticamente esse processo (PAPHITOU, 2013; LOUREIRO et al, 2016).

Antigamente acreditava-se que a resistência bacteriana ocorria somente no ambiente hospitalar, no entanto hoje sabe-se que o uso extensivo e indiscriminado de antibióticos na medicina, na veterinária, na agricultura e na pecuária são fatores que corroboram com o

aumento da resistência bacteriana as drogas disponíveis no mercado, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo (GUMBO, 2012).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos podem acontecer de diferentes formas: 1) Alteração ou destruição do antibiótico por enzimas específicas, como é caso das  $\beta$ -lactamases que tem como alvo os agentes  $\beta$ -lactâmicos; 2) Redução da permeabilidade celular ao antibiótico ou bombas de efluxo dos antibióticos, pois ambos evitam a acumulação do fármaco no interior das células bacterianas; 3) Alterações nas moléculas alvo dos antibióticos, como acontece com as bactérias do gênero *Enterococcus* que apresentam resistência intrínseca às cefalosporinas; 4) Produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico (HAWKEY, 1998; FORBES et al, 2007).

Com relação a resistência fúngica, Snelders (2008) afirmou que esse processo ocorre quando há a exposição prolongada de fungos aos compostos azólicos em ambiente hospitalar ou agrícolas. Dentre os fungos, *Candida* spp. foi descrito como o principal gênero isolado de infecções em humanos que apresentaram aumento na resistência a antifúngicos, principalmente a compostos azólicos (DA COSTA et al, 2009; PAM et al, 2012; MALDONADO et al, 2014; NEVES-JUNIOR et al, 2015). Uma vez que, estes antifúngicos, principalmente o fluconazol, são os mais utilizados na prevenção e no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. e isso pode ter ocasionado o aumento da resistência fúngica a esses fármacos (SILVA et al, 2013b; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

A resistência antimicrobiana gera consequências clínicas como o aumento de doenças infecciosas já estabelecidas e emergentes, uma vez que muitas linhagens evoluíram para forma multirresistentes e estão associadas a infecções nosocomiais graves, difíceis de combater (GUMBO, 2012). Além disso, há também as consequências econômicas, pois, as opções terapêuticas para esses microrganismos resistentes são limitadas ou até indisponíveis o que gera uma permanência prolongada do paciente no hospital aumentando consideravelmente os custos dos cuidados de saúde (PAPHITOU, 2013; LOUREIRO et al, 2016).

## **2.6 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Trichoderma* spp.**

Os metabólitos secundários são substâncias bioativas de origem natural, com baixo peso molecular, sintetizadas na fase estacionária sob condições específicas (SPECIAN et al,

2014). No meio ambiente a síntese metabólica está relacionada com os fatores bióticos e abióticos e para o cultivo em laboratório, os parâmetros como tempo, temperatura, pH e nutrientes podem influenciar na produção destes metabólitos (SPECIAN *et al*, 2014).

Dentre os organismos produtores de substâncias bioativas, os fungos têm se destacado, justamente por serem produtores efetivos de metabólitos secundários de interesse industrial, além de serem fonte renovável de obtenção dessas substâncias (CRAGG *et al*, 2012).

Os metabólitos secundários de origem fúngica apresentam atividades bioativas: antitumorais, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, imunossupressoras, antiparasitárias, antibióticas, entre outras. Nesse sentido, os metabólitos com ação antimicrobiana têm sido amplamente pesquisados, com o intuito de desenvolver novos fármacos eficazes no tratamento de doenças infecciosas (SILVA, 2014; SPECIAN *et al*, 2014).

*Trichoderma* spp. produz uma gama de metabólitos secundários, como pironas, terpenos, esteroides, gliotoxinas, gliovirinas, peptaibols e outros, alguns dos quais têm relevância médica e biotecnológica (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; MUKHERJEE *et al*, 2013). Nos últimos tempos, *Trichoderma* spp. têm sido amplamente estudados como agentes antimicrobianos contra fitopatógenos e patógenos, podendo ser uma alternativa para a descoberta de novas moléculas ou substâncias de interesse farmacêutico (FARHA; BROWN, 2016).

Nesse sentido, Garbin (2011) isolou fungos endofíticos e epifíticos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* MARTIUS 1824) e realizou testes antimicrobianos contra os seguintes patógenos: *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), MRSA (*S. aureus* metilcilina aminoglicosídeo resistente) e *C. albicans* (ATCC 10231). *Trichoderma* sp., quando cultivado em BDA, inibiu o crescimento somente de *S. aureus*, apresentando halo de inibição de 8 a 10 mm e, quando cultivado em Sabouroud, inibiu *S. aureus* e *E. coli* com halo de inibição de 6 a 10 mm. Além disso, inibiu uma cepa de *S. aureus* MRSA com os dois meios testados, apresentando halo de inibição de 12 a 16 mm.

Moreira (2013) isolou *Trichoderma* sp. (UFMGCB 8203) de folhas de *Araucaria angustifolia* e realizou extração etanólica a partir do cultivo em meio BDA. Posteriormente, a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos foram testados quanto os patógenos: *S. aureus* (ATCC 12600), *E. coli* (ATCC, 11775), *P. aeruginosa* (ATCC 10145), *C. albicans* (ATCC 60193), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. sphaerospermum* (CCT 1740). Os resultados

obtidos mostraram a inibição no crescimento contra *S. aureus* e *E. coli*, bem como contra o fungo *C. sphaerospermum*.

Pires et al. (2015) testaram o potencial antibacteriano de fungos endofíticos isolados dos cactos da Floresta Tropical Seca brasileira (Caatinga) contra bactérias patogênicas ao homem. Dentre os fungos isolados, *T. longibrachiatum* Rifai inibiu sete dos dez patógenos testados: *S. aureus* Rosenbach (UFPEDA02), *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann & Neumann (UFPEDA71), *E. faecalis* (Andrewes & Horder) Schleifer & Kilpper-Bälz (UFPEDA138), *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn (UFPEDA86), *Micrococcus luteus* (UFPEDA100), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA414) e uma cepa multirresistente de *S. aureus* (UFPEDA 663).

Portando, os estudos acima citados evidenciam o potencial de *Trichoderma* spp. como fonte promissora para a descoberta de novas moléculas ou substâncias para o tratamento efetivo de doenças infecciosas de origem bacteriana e fúngica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Analisar *in vitro* a atividade antimicrobiana de *Trichoderma* spp. contra fungos e bactérias de importância médica.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana das linhagens de *Trichoderma* através do método do bloco de gelose por difusão em ágar;

Identificar a concentração mínima inibitória dos extratos metabólicos de *Trichoderma* spp. contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, levedura e fungo filamentoso;

Identificar a concentração bactericida mínima e a concentração fungicida mínima dos extratos metabólicos de *Trichoderma* spp.;

Avaliar o grau de toxicidade dos extratos metabólicos de *Trichoderma* em náuplios de *Artemia salina* e identificar a CL<sub>50</sub> dos extratos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos

#### 4.1.1 Seleção, reativação e manutenção das culturas de *Trichoderma*

Foram utilizadas seis linhagens de *Trichoderma* spp. (TABELA 1), selecionadas em testes anteriores, obtidas da Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, pertencente à Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia.

Os fungos foram reativados em meio sólido Batata, Dextrose e Ágar - BDA (TABELA 2), pH 5,0 e incubados a 28 °C, sem luminosidade, durante oito dias. Este protocolo, também, foi utilizado para a manutenção das culturas durante a realização dos experimentos.

Tabela 1 - Linhagens de *Trichoderma* selecionadas para a avaliação da atividade antimicrobiana

Espécie	Nº de registro da cultura	Local de isolamento
<i>Trichoderma crassum</i>	CFAM 0235	*Solo CIGS – Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0767	Solo CIGS – Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0837	Solo CIGS – Manaus/Am
<i>Trichoderma harzianum</i>	CFAM 1172	**Solo Reserva Mamirauá - Tefê/AM
<i>Trichoderma virens</i>	CFAM 1376	Água Município Rural do Lago do Limão – Iranduba /AM
<i>Trichoderma virens</i>	CFAM 1379	Água Município Rural do Lago do Limão – Iranduba /AM

Nota: \*CIGS: Centro de Instrução de Guerra na Selva \*\* Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá

Tabela 2 - Formulação do meio BDA

Quantidade/volume (g/L)	Componentes
200 g	Batata portuguesa
20 g	Dextrose (Kasvi)
20 g	Ágar (Kasvi)
1 L	Água destilada

#### 4.1.2 Seleção, reativação e manutenção das culturas de bactérias e fungos

Nos testes biológicos foram utilizadas seis bactérias, sendo três Gram-positivas e três Gram-negativas, uma espécie de levedura e uma espécie de fungo filamentosos (TABELA 3). As bactérias foram acessadas da Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM e os fungos foram obtidos da Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, ambos pertencente à Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia.

As bactérias foram reativadas em meio sintético Ágar Mueller-Hinton - AMH (Merck), pH 5,0 e incubadas na Demanda Bioquímica de Oxigênio - BOD a 37 °C, por 24h. A levedura foi cultivada em Ágar Saboraud - SAB (TABELA 4), pH 5,6 e incubada a 28 °C, por 48h, o fungo filamentosos foi cultivado em BDA, pH 5,0 e incubado a 28 °C durante oito dias. Essas condições de cultivo foram utilizadas para a manutenção dos microrganismos durante os experimentos.

Tabela 3 - Microrganismos selecionados para a realização dos testes antimicrobianos

Microrganismo	Espécie	Nº de registro da cultura	Local de isolamento
Bactérias Gram-positivas	<i>Bacillus cereus</i>	CBAM 0549	Ambiente (solo)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CBAM 0629	Amostra clínica
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CBAM 0614	Amostra clínica
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	CBAM 0001	Amostra clínica
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CBAM 0665	Ambiente (água)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CBAM 0672	Amostra clínica
Levedura	<i>Candida albicans</i>	CFAM 1186	Amostra clínica
Fungo filamentosos	<i>Aspergillus niger</i>	CFAM 050	Ambiente (solo)

Tabela 4 - Formulação do meio SAB

Quantidade/volume (g/L)	Componentes
30 g	Dextrose (Kasvi)
20 g	Peptona (Fisher Scientific)
15 g	Ágar (Kasvi)
1 L	Água destilada

## 4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido

A avaliação da atividade antimicrobiana das linhagens de *Trichoderma* foi realizada primeiramente em meio sólido pelo método do bloco de gelose por difusão em ágar, segundo as descrições de Ichikawa et al, (1971) e Teixeira et al, (2011).

### 4.2.1 Cultivo dos microrganismos

#### 4.2.1.1 *Trichoderma*

Inicialmente as linhagens de *Trichoderma* (CFAM 0235, CFAM 0767, CFAM 0837, CFAM 1172, CFAM 1376 e CFAM 1379) descritas na Tabela 1, foram cultivadas em meio BDA, sem luminosidade, a 28 °C, durante oito dias.

#### 4.2.1.2 Cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido e padronização do inóculo

A linhagem de *A. niger* (CFAM 050) foi cultivada em meio sólido seguindo o mesmo protocolo utilizado no cultivo de *Trichoderma*, no entanto após o período de incubação foram adicionados 10 mL da solução esterilizada de água destilada e glicerol 10% na placa de Petri formando uma suspensão de micélio e esporos. Em seguida, esta suspensão foi colocada em tubo tipo Falcon, homogeneizada em agitador de tubos vórtex e posteriormente levada para contagem de células em câmara de Neubauer para que fossem realizadas as padronizações dos inóculos de *A. niger* ( $1,0 \times 10^5$  esporos/mL).

#### 4.2.1.3 Cultivo da levedura, das bactérias e padronização dos inóculos

A linhagem de *C. albicans* (CFAM 1186) foi cultivada em meio SAB e incubada sem luminosidade a 28 °C, por 48h. As linhagens de bactérias (CBAM 0001, CBAM 0549, CBAM 0614, CBAM 0629, CBAM 0665 e CBAM 0672) descritas na tabela 3, foram semeadas em placas de Petri contendo o meio AMH e incubadas na BOD, sem luminosidade, a 37 °C, durante 24h.

Após os respectivos períodos de incubação dos microrganismos supracitados foram preparadas as suspensões celulares, para isto foram retiradas com a alça de platina, colônias isoladas de cada cultura e adicionadas em tubos de ensaio contendo solução salina 0,85% previamente esterilizada.

Em seguida, foram medidas as densidades ópticas das suspensões celulares, através da leitura em espectrofotômetro (Biospecto) com comprimento de onda a 625 nm para as bactérias e 530 nm para a levedura, com um valor de absorvância compreendido entre 0,08 – 0,1 (bactérias) e 0,12 – 0,15 (levedura), cuja turbidez era semelhante à coluna 0,5 da escala de McFarland o que correspondente a  $1,5 \times 10^8$  Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL) para bactérias e  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL para levedura (BONA et al, 2016).

#### 4.2.2 Teste do Bloco de gelose

Após a padronização das suspensões celulares, foram retirados 150 µL de cada suspensão celular e inoculados com auxílio de cotonetes na superfície da placa de Petri com os seguintes meios de cultura: AMH (bactérias), SAB (*C. albicans*) e BDA (*A. niger*). Nesses

cultivos foram sobrepostos três discos com  $\pm 8$  mm de diâmetros retirados da área central das culturas de *Trichoderma* crescidas em BDA. Em seguida, as placas cultivadas foram incubadas na BOD a 37 °C por 24h para o crescimento das bactérias, 28 °C por 48h para *C. albicans* e 28 °C por oito dias para *A. niger* (FIGURA 3).

O controle positivo foi realizado com a aplicação de discos de papel de filtro contendo Cloranfenicol e Itraconazol (5 mg/ mL) no centro das placas e o controle do meio de cultivo foi realizado inoculando-se somente blocos de ágar de BDA sobre os microrganismos testados.

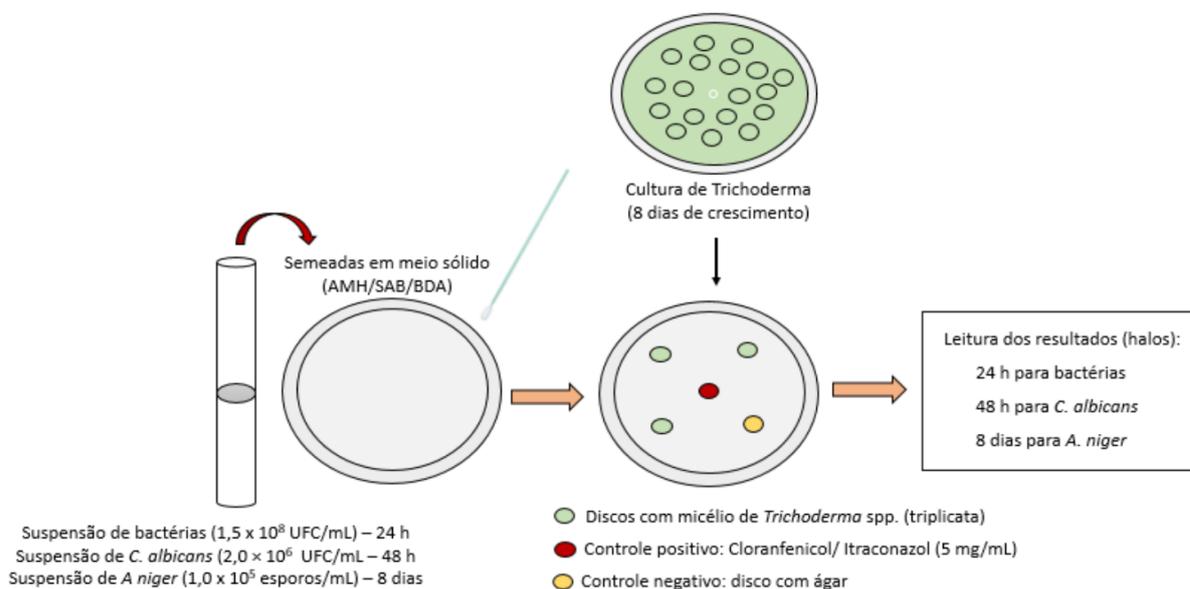


Figura 3 – Esquema da metodologia utilizada no teste do bloco de gelose

Fonte: A autora (2020).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita de forma qualitativa com intuito de selecionar linhagens bioativas que apresentassem atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Desta forma, a leitura do resultado foi feita com base na presença ou ausência de halos de inibição e a medição dos mesmos foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital (mm). As médias aritméticas das triplicatas foram analisadas no programa Microsoft Office Excel 2013. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a Tabela 5, seguindo as descrições de Ergorv (1994 apud SADYKOVA et al, 2015, p. 356).

Tabela 5 - Classificação do grau de sensibilidade de acordo com as médias dos halos de inibição do teste do bloco de gelose

Tamanho do halo de inibição (mm)	Grau de sensibilidade
0	Ausência de sensibilidade
1 - 12	Baixa sensibilidade
13 - 29	Média sensibilidade
$\geq 30$	Alta sensibilidade

### 4.3 Cultivo de *Trichoderma* spp. em meio líquido

A partir dos resultados do bloco de gelose foram selecionadas e cultivadas em meio líquido, três linhagens de *Trichoderma* (CFAM 0235, CFAM 0767 e CFAM 1172) para a obtenção dos extratos metabólicos.

Primeiramente os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados sem luminosidade à 28 °C, durante oito dias. Após esse período foi realizada a padronização dos inóculos em  $1,0 \times 10^5$  esporos/mL através da contagem de células na câmara de Neubauer.

Os inóculos foram adicionados em dez Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo Batata, Dextrose - BD modificado com a adição do Extrato de levedura (TABELA 6) e meio Farelo de Trigo - FT (TABELA 7), totalizando 1000 mL de cultivo de cada fungo nos meios de cultivo.

Tabela 6 - Formulação do meio BD modificado com a adição do extrato de levedura

Quantidade/volume (g/L)	Componentes
200 g	Batata portuguesa
20 g	Dextrose (Kasvi)
2 g	Extrato de levedura (Becton Dickinson)
1 L	Água destilada

Tabela 7 - Formulação do meio FT\*

Quantidade/volume (g/L)	Componentes
60 g	Farelo de trigo tipo grosso
20 g	Dextrose (Kasvi)
1L	Água destilada

\*(Oliveira, 2019).

Os Erlenmeyers com as culturas de fungos foram incubados em agitador orbital com agitação contínua de 150 rpm, a 28 °C, durante dez dias (TABELA 8). O controle do meio de cultivo foi feito com os Erlenmeyers contendo somente os meios de cultivo.

Tabela 8 - Condições utilizadas no cultivo submerso das três linhagens de *Trichoderma* selecionadas para a obtenção dos extratos metabólicos

Meio de cultura	pH	Temperatura (°C)	Tempo	Luminosidade	Velocidade de agitação (rpm)
BD	5,0	28	10 dias	Ausência de luz	150
FT	5,0	28	10 dias	Ausência de luz	150

#### 4.4 Obtenção dos extratos metabólicos de *Trichoderma* spp.

##### 4.4.1 Separação da biomassa micelial do meio de cultura fermentado

Após o cultivo submerso foi realizada a filtração a vácuo das culturas, para realizar a separação da biomassa micelial do meio de cultura fermentado. Para isso, foi utilizado um sistema de filtração à vácuo (Membrana PES 0,22 µm – Kasvi) acoplado à bomba de sucção a vácuo.

A biomassa micelial foi mantida em estufa de secagem analógica a 30 °C até a secagem completa dos micélios que durou aproximadamente quatro dias, enquanto que com o caldo de cultivo foi realizada a extração química empregando a técnica de Partição líquido-líquido – PLL utilizando o solvente Acetato de Etila 100% (AcOEt) Synth®.

##### 4.4.2 Extração química dos metabólitos intracelulares

Após a obtenção da biomassa do micélio seco, este foi pesado em balança analítica para saber o rendimento micelial de cada cultura, em seguida foram macerados em almofariz e colocados em Erlenmeyes de 250 mL. Para cada miligrama de micélio foram adicionados 10 mL do solvente AcOEt, os quais ficaram extraíndo de forma estática na capela de exaustão de gases durante 96 horas, seguido de banho ultrassom (UNIQUE, modelo USC-2800, 40 Hz) por 20 minutos.

A seguir, foi realizada a filtração simples utilizando funil de Büchner de porcelana e papel filtro (Quanty), assim a fase orgânica foi adicionada em tubos de vidro, previamente pesados, e após a evaporação completa do solvente na capela de exaustão de gases, os extratos metabólicos obtidos foram pesados e acondicionados em geladeira até a realização dos testes biológicos.

O cálculo do rendimento dos extratos proveniente do micélio seco foi realizado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Rendimento do extrato (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

Onde: m2: massa do extrato (g)  
m1: massa do micélio seco (g)

#### 4.4.3 Extração química dos metabólitos extracelulares de *Trichoderma* spp.

Os metabólitos extracelulares foram extraídos do meio de cultivo fermentado, através da PLL utilizando o solvente AcOEt. Primeiramente, o volume do meio fermentado foi medido com auxílio de uma proveta, com intuito de saber o rendimento da amostra e conseqüentemente o volume de solvente utilizado em cada partição (v:v). Foram realizadas duas extrações no funil de separação em cada cultura de *Trichoderma*, a seguir a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica com AcOEt foi concentrada no evaporador rotativo a pressão reduzida a 60 rpm com temperatura de 30 °C, seguido de secagem completa do solvente na capela de exaustão de gases. Após secos, os extratos foram pesados para saber os rendimentos e acondicionados em geladeira até a utilização nos testes biológicos.

As etapas realizadas para a obtenção dos extratos metabólicos das linhagens de *Trichoderma* constam a seguir na figura 4.

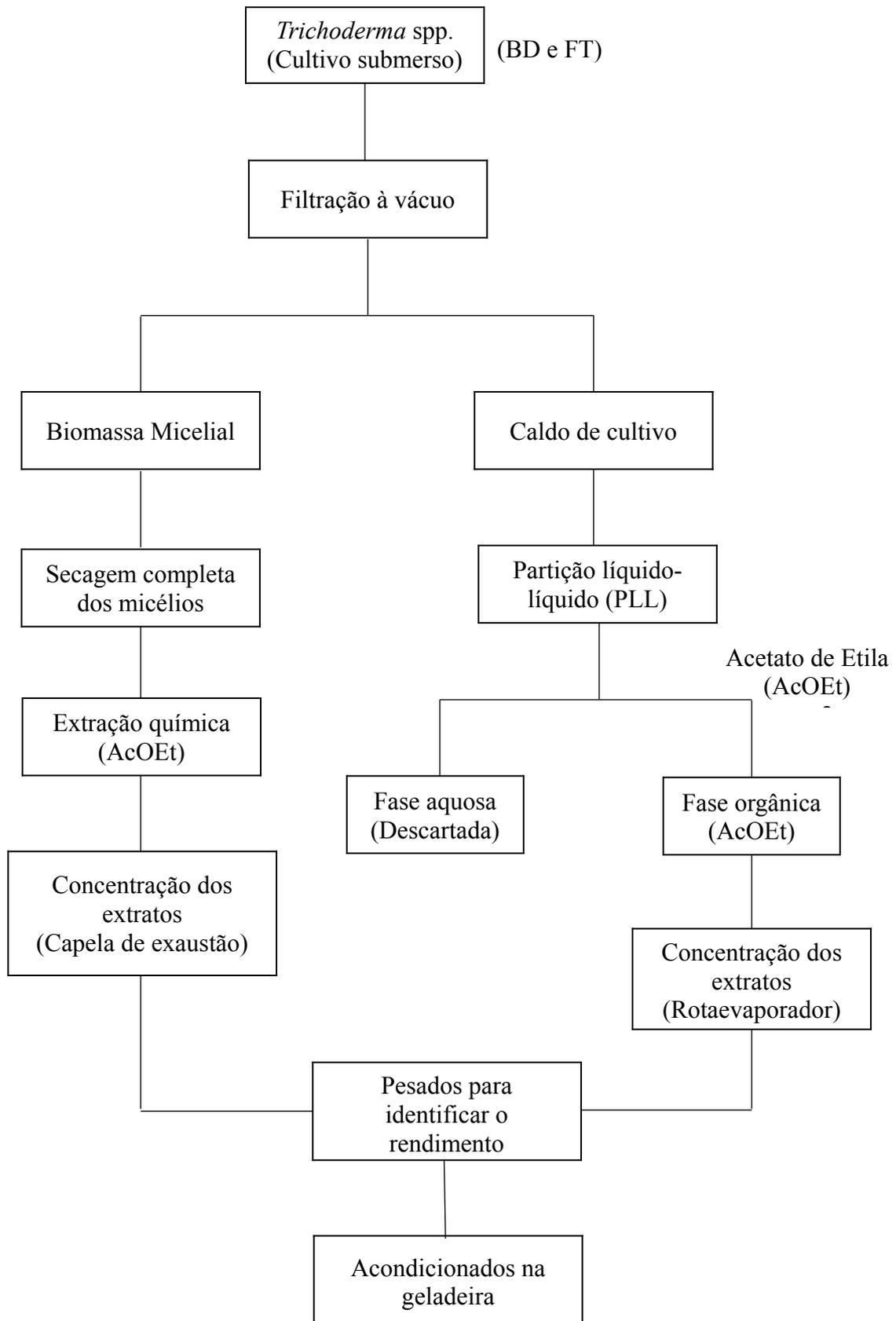


Figura 4 - Fluxograma representando a obtenção dos extratos metabólicos de *Trichoderma* spp. após o cultivo submerso nos meios BD e FT  
Fonte: A autora (2020).

#### 4.5 Concentração Mínima Inibitória-CMI

A CMI foi determinada pelo método de microdiluição, seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2012), documento M07-A9, com adaptações para realização do teste com a levedura utilizando o meio SAB e da leitura dos resultados em espectrofotômetro de microplacas (Bio Rad iMark™) com valor de absorvância 0,05.

##### 4.5.1 Teste da CMI em microplacas de 96 poços

Os doze extratos de *Trichoderma* spp. obtidos do cultivo submerso foram pesados e solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) 5% na concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup>, assim ao inocular-se 100 µL do extrato nos poços da linha A, a concentração inicial dos testes foi de 2 mg/mL.

Nas microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de caldo Mueller-Hinton para bactérias ou 100 µL caldo Saboraud para a levedura em todos os poços da linha A até G, em seguida foram adicionados 100 µL dos extratos em quadruplicata, pois um poço é referente ao branco de cada concentração (coluna 1, 5 e 9) e três poços são referentes ao teste (colunas 2-4, 6-8, 10-12) (TABELA 9 e FIGURA 5).

Tabela 9 – Esquema utilizado para o preenchimento das microplacas para o teste da concentração mínima inibitória.

	Branco teste	Teste	Branco Solvente	Controle Solvente	Branco Controle positivo	Controle positivo	Controle Negativo	Controle Positivo Meio de cultura
	----- (µL) -----							
	-----							
Caldo MH / Caldo SAB	120	100	70	50	70	50	100	120
Extratos	100*	100*	-	-	-	-	-	-
Microrganismo	-	20	-	20	-	20	20	-
DMSO 5%	-	-	50	50	-	-	-	-
Clorafenicol/ Itraconazol	-	-	-	-	50	50	-	-

Fote: A autora (2020).

Nota: \*Os extratos foram adicionados apenas na linha A em quadruplicata (um poço referente ao branco e três poços-teste). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL da linha A para a linha B e assim sucessivamente até alcançar a linha G, totalizando um volume de 120 µL em cada poço.



Figura 5 – Método de inoculação utilizado para determinação da concentração mínima inibitória – CMI dos extratos de *Trichodema* spp.  
Fonte: A autora (2020).

Após isso, foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100  $\mu$ L da linha A para a linha B e assim sucessivamente até alcançar a linha G, assim totalizando as sete diluições testadas: 2,00, 1,00, 0,50, 0,25, 0,12, 0,06 e 0,03 mg/mL. Os 100  $\mu$ L retirados da linha G, foram descartados, pois a linha H foi utilizada para os controles, sendo realizado o controle positivo com cloranfenicol 30  $\mu$ g/mL ou Itraconazol 30  $\mu$ g/mL, o controle negativo com solvente DMSO 5% e controle de crescimento do microrganismo com caldo Mueller-Hinton ou caldo Saboraud.

Nos poços-teste foram inoculados 20  $\mu$ L da suspensão celular dos microrganismos preparadas conforme as descrições do tópico 4.2.1.3, no entanto após o procedimento descrito, foi realizada uma nova diluição em caldo Mueller-Hinton/Caldo Saboraud até que fosse alcançada a concentração  $2,5 \times 10^6$  UFC/mL. Portanto, ao inocular-se 20  $\mu$ L da suspensão no poço-teste a concentração de microrganismo foi de  $5 \times 10^4$  UFC/poço, que é a concentração indicada pelo CLSI.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h para as bactérias e 28 °C por 48 h para levedura e após esse período foi realizada a leitura de absorbância 0,05 em espectrofotômetro Bio Rad iMark™ com comprimento de onda de 595 nm.

A CMI foi determinada como a menor concentração do extrato fúngico capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo testado.

#### 4.6 Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Os bioensaios para a determinação da CBM e a CFM foram realizados em triplicata, segundo as descrições de Santurio et al, (2007) e Bona et al, (2014).

Foram retiradas alíquotas de 10 µL dos poços em que não apresentaram crescimento microbiano no teste da CMI, de acordo com os resultados da leitura espectrofotométrica, e inoculadas nas placas de Petri contendo meio ágar Mueller-Hinton ou Saboraud, em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para as bactérias e 28 °C por 48 h para a levedura.

Após o período, nas placas onde houve crescimento visível do microorganismo sobre o ágar Mueller-Hinton/Saboraud, o extrato foi considerado bacteriostático/fungistático e naquelas onde não houve crescimento microbiano aparente, o extrato foi considerado bactericida/fungicida. Logo, a CBM e a CFM foram consideradas como a menor concentração dos extratos de *Trichoderma* spp. que apresentaram ação bactericida/fungicida.

#### 4.7 Teste de toxicidade com larvas de *Artemia salina*

##### 4.7.1 Cultivo de *Artemia salina*

Para o cultivo dos microcrustáceos foi inicialmente preparada, em um balão de fundo chato, 500 mL de solução salina (sal marinho não-iodado – Tropic Marin® - 35,5 g) com pH 8,5. A seguir, foram adicionados 50 mg de cistos de *A. salina* e incubados a 25 °C ± 2 com aeração e iluminação constantes durante 24h, para que houvesse a eclosão das larvas (náuplios).

##### 4.7.2 Preparo das soluções estoque dos extratos e do controle positivo

Para o preparo das soluções estoque dos extratos metabólicos de *Trichoderma* spp. foram pesados, em balança analítica, 0,05 g de cada extrato, os quais foram solubilizados em 0,05 mL de Tween 80 (polissorbato), em seguida foram adicionados 9,9 mL de solução fisiológica a 0,9%, totalizando 10 mL de solução estoque para cada extrato.

O controle positivo consistiu na solução de 0,05 mL de Tween 80 e 9,9 mL de solução fisiológica a 0,9%.

### 4.7.3 Bioensaio

Nas linhas A-D da coluna 1 das microplacas de 24 poços, foram adicionados os controles positivos de cada extrato, onde foram adicionados 2 mL de solução salina e 200  $\mu$ L da solução controle. Nas linhas A-D das colunas 2-6 foram os poços-teste, nestes foram adicionados 2 mL de solução salina e 200  $\mu$ L da solução estoque dos extratos com a concentração inicial de 700  $\mu$ g/mL (FIGURA 6).

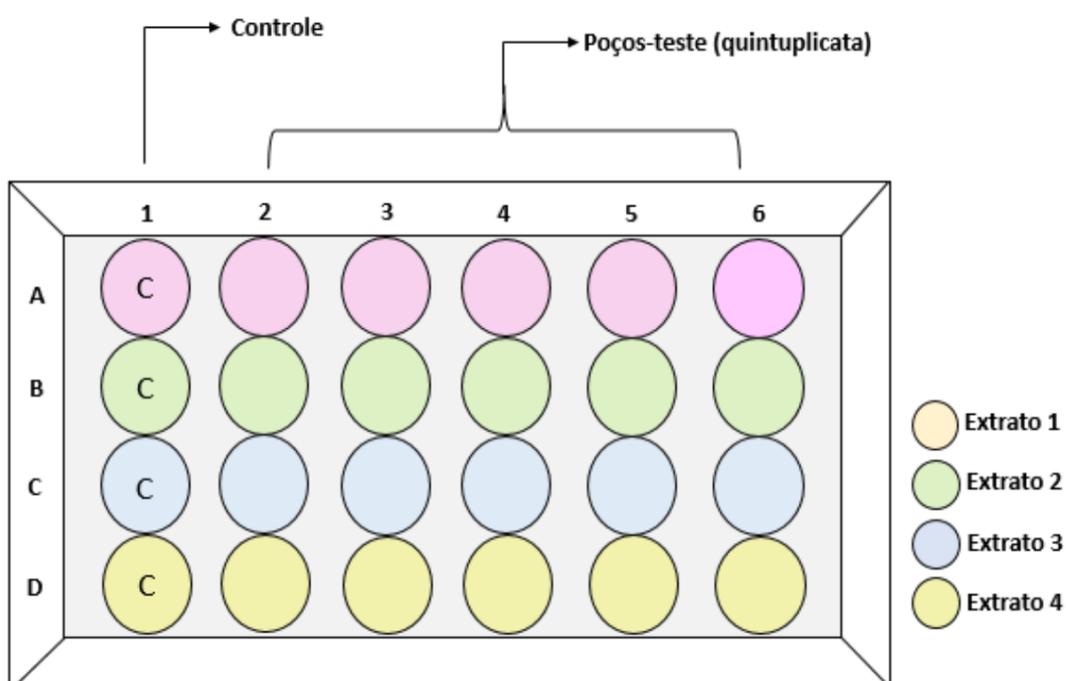


Figura 6 – Método de inoculação utilizado para determinar a Concentração letal média - CL50 dos extratos de *Trichoderma* spp. contra *Artemia salina*.  
Fonte: A autora (2020).

Em seguida foram adicionados dez náuplios de *A. salina* em todos os poços (controle e teste), posteriormente as placas foram incubadas a 28 °C durante 24 h. Assim, em cada linha da microplaca foram testados um extrato distinto em quintuplicata, com volume final de 2,2 mL em cada poço.

Após as 24 e 48 h de incubação foram realizadas as contagens dos náuplios mortos ou com perda de movimento para a determinação da CL<sub>50</sub> de acordo com o método Mayer et al, (1982). No entanto, a partir dos resultados obtidos dos testes com a concentração inicial de 700  $\mu$ g/mL, os extratos que não apresentaram letalidade aos náuplios ou aqueles apresentaram

letalidade acima de total da população, foram reavaliados em concentrações menores (500, 250, 125 µg/mL) de acordo com a necessidade.

Vale ressaltar que além do controle testado em cada experimento, foi preparada uma placa somente para o controle das larvas, totalizando assim 4 poços-controle para cada concentração avaliada.

A mortalidade dos náuplios foram observadas após 24 e 48 h de incubação. O cálculo da porcentagem de mortalidade foi realizado de acordo com Teixeira et al. (2011):

$$\% M = (\text{n}^\circ \text{ de indivíduos mortos} / \text{totais de indivíduos}) \times 100$$

Onde: % M = porcentagem de mortalidade dos náuplios

A classificação da toxicidade dos extratos metabólicos de *Trichoderma* spp. foi realizada de acordo com a porcentagem de mortalidade dos náuplios, segundo as descrições da tabela 10:

Tabela 10 - Classificação da toxicidade ds extratos de *Trichoderma* spp. de acordo com as mortalidades dos náuplios de *Artemia salina*.

Mortalidade (%)	Classificação (sigla)
0 – 9	Não tóxico (NT)
10 – 49	Ligeiramente tóxico (LT)
50 – 89	Tóxico (T)
90 – 100	Altamente tóxico (AT)

Fonte: Harwig e Scott (1971).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste do bloco de gelose por difusão em ágar

O teste do bloco de gelose teve como intuito selecionar linhagens de *Trichoderma* bioativas que apresentaram atividade antimicrobiana contra um ou mais dos oito microrganismos testados, sendo eles: três bactérias Gram-positivas: *B. cereus*, *S. epidermidis* e *S. aureus*; três bactérias Gram-negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, uma levedura: *C. albicans* e um fungo filamentosos: *A. niger*.

Com base nos resultados obtidos, observou-se que as seis linhagens *T. crassum* (1), *T. harzianum* (1), *T. virens* (2) e *Trichoderma* sp. (2) avaliadas neste trabalho apresentaram atividade antibacteriana contra uma ou mais cepas de bactérias com diferentes tamanhos de halo de inibição (TABELA 11 e FIGURA 7).

Assim, a partir das análises das médias dos halos de inibição entre as triplicatas de cada teste, foi possível classificar o grau de sensibilidade (ausência de sensibilidade, baixa sensibilidade, média sensibilidade e alta sensibilidade) dos microrganismos testados contra *Trichoderma* spp. (TABELA 11).

Tabela 11 – Resultado do teste do bloco de gelose de *Trichoderma* spp. contra bactérias e fungos de importância médica (média das triplicatas dos halos de inibição - mm).

Fungos	Microrganismos*							
	CBAM 0001	CBAM 0549	CBAM 0614	CBAM 0629	CBAM 0665	CBAM 0672	CFAM 1186	CFAM 050
	Halo de inibição (mm)							
<i>T. crassum</i> - CFAM 0235	19,3	9,6	24,6	27,0	0,0	9,0	9,3	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1172	22,0	13,3	16,3	24,3	21,0	16,6	15,6	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 1376	19,3	9,3	39,3	19,3	17,6	15,6	12,3	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 1379	22,6	6,3	23,0	24,0	20,3	20,6	14,3	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0767	25,6	18,3	34,6	22,6	0,0	17,6	14,3	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0837	0,0	0,0	13,3	0,00	0,0	0,0	19,3	0,0

\**E. coli* (CBAM 0001), *B. cereus* (CBAM 0549), *S. epidermidis* (CBAM 0614), *S. aureus* (CBAM 0629), *P. aeruginosa* (CBAM 0665), *K. pneumoniae* (CBAM 0672), *C. albicans* (CFAM 1186) e *A. niger* (CFAM 050).

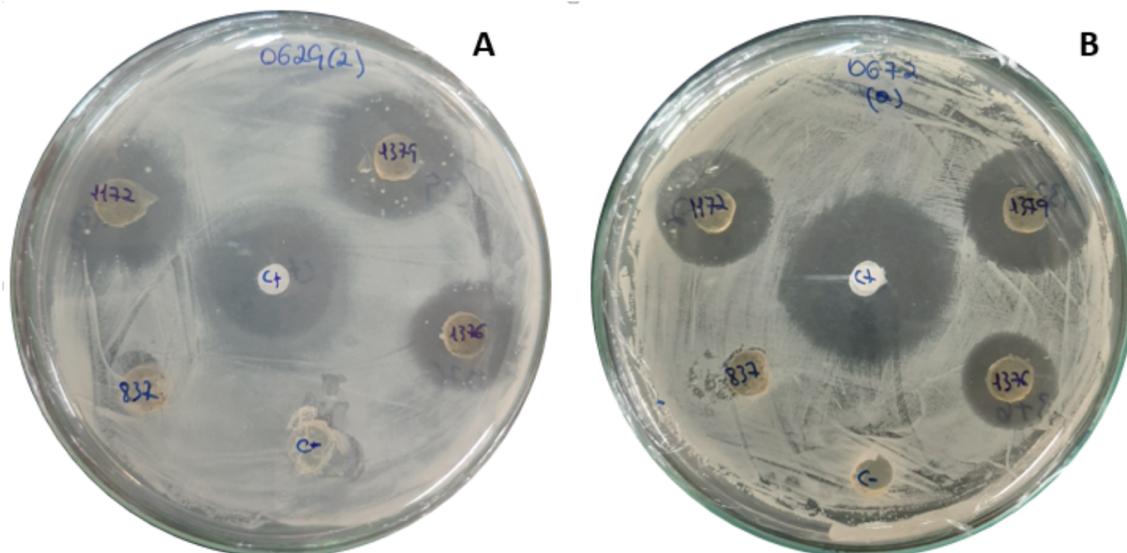


Figura 7- Diferentes tamanhos dos halos de inibição de *Trichoderma* spp., observados no teste do bloco de gelose. A: *Trichoderma* sp. (CFAM 0837), *T. harzianum* (CFAM 1172) e *T. virens* (CFAM 1376 e CFAM 1379) testados contra *Staphylococcus aureus* (CBAM 0629). B: *Trichoderma* sp.  
Fonte: A autora (2020).

A linhagem *T. harzianum* (CFAM 1172) apresentou atividade contra todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas selecionadas para este estudo, demonstrando diferentes tamanhos de halos de inibição, com as médias variando de 13,33 mm contra *B. cereus* a 24,33 mm contra *S. aureus*.

Estes dados corroboram com os resultados de Sadykova et al. (2015), que avaliaram a atividade antibacteriana através da técnica de disco-difusão em ágar, dos extratos de 42 cepas de oito espécies de *Trichoderma*, dentre elas quatro cepas de *T. harzianum*, as quais apresentaram inibição em diferentes graus de sensibilidade a pelo menos três das quatro bactérias Gram-positivas testadas, incluindo uma cepa de *S. aureus* resistente. Além disso, duas cepas inibiram as duas bactérias Gram-negativas avaliadas, com destaque para a cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Neste sentido, Saad (2016) analisou a atividade antibacteriana do extrato de *T. harzianum* através da técnica de difusão em ágar por poço contra nove bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dentre elas *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. E assim como no presente estudo, *T. harzianum* também se mostrou ativo e inibiu o crescimento de todas as bactérias avaliadas.

Com base nisto, observou-se a eficiência da linhagem *T. harzianum* (CFAM 1172) em inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas de interesse médico como as avaliadas neste estudo. No entanto, apesar dos diferentes tamanhos de halos de inibição, as

médias encontram-se dentro do intervalo de 13–29 mm, o que indica um grau médio de sensibilidade dos microrganismos-teste ao agente antibacteriano (TABELA 12).

As duas linhagens de *T. virens* (CFAM 1376 e CFAM 1379) também inibiram todas as bactérias avaliadas, mas demonstraram uma variação maior entre o tamanho dos halos de inibição entre as cepas. Desta maneira, foi possível observar que houve diferentes graus de sensibilidade das bactérias aos agentes antibacterianos, uma vez que a *E. coli* (CBAM 0001) demonstrou sensibilidade média às duas linhagens de *T. virens*. Porém, *B. cereus* (CBAM 0549) apresentou baixa sensibilidade para ambas as linhagens. Diferente de *S. epidermidis* (CBAM 0614), que expressou alta sensibilidade a *T. virens* (CFAM 1376) e média a *T. virens* (CFAM 1379), da mesma forma *S. aureus* (CBAM 0629), *P. aeruginosa* (CFAM 0665) e *K. pneumoniae* (CBAM 0672) apresentaram sensibilidade média, mas a ambas as linhagens de *T. virens*.

Saleh et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana através da técnica de difusão em ágar por poço, do extrato bruto de *T. virens*, contra doze bactérias patogênicas, dentre elas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, incluindo uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). O extrato bruto de *T. virens* se mostrou eficiente contra *E. coli* com halo de inibição de 12 mm, a *S. aureus* com 10 mm e a MRSA com halo de inibição de 12 mm. No entanto, *T. virens* não foi capaz de inibir as cepas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, diferentes dos resultados encontrados nesta pesquisa, pois as linhagens de *T. virens* (CFAM 1376 e CFAM 1379) foram ativas contra *K. pneumoniae* (CBAM 0672) e a *P. aeruginosa* (CBAM 0665) ambas apresentando sensibilidade média às duas linhagens testadas.

Apesar dos resultados promissores de *T. virens* encontrados nesta avaliação, poucos trabalhos foram publicados recentemente com o intuito de avaliar o potencial antimicrobiano desta espécie contra patógenos humanos. Isso indica a necessidade da continuidade dos estudos com *T. virens* para verificar sua eficiência antimicrobiana, assim como seu espectro de ação contra microrganismos de interesse médico.

Tabela 12 – Grau de sensibilidades dos microrganismos-teste as linhagens de *Trichoderma* spp.

Fungos	Microrganismos							
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
	CBAM 0001	CBAM 0549	CBAM 0614	CBAM 0629	CBAM 0665	CBAM 0672	CFAM 1186	CFAM 050
Halo de inibição (mm)								
<i>T. crassum</i> - CFAM 0235	++	+	++	++	-	+	+	-
<i>T. harzianum</i> – CFAM 1172	++	++	++	++	++	++	++	-
<i>T. virens</i> – CFAM 1376	++	+	+++	++	++	++	+	-
<i>T. virens</i> – CFAM 1379	++	+	++	++	++	++	++	-
<i>Trichoderma</i> sp. – CFAM 0767	++	++	+++	++	++	++	++	-
<i>Trichoderma</i> sp. – CFAM 0837	-	-	++	-	-	-	++	-

Leitura: (-) 0 mm = sem sensibilidade, (+) até 12 mm = baixa sensibilidade, (++) 13–29 mm: média sensibilidade e (+++) a partir de 30 mm: alta sensibilidade.

*Trichoderma crassum* (CFAM 0235) e *Trichoderma* sp. (CFAM 0767) inibiram cinco das seis bactérias avaliadas neste estudo com diferentes graus de sensibilidade. Desta forma, ambas as linhagens apresentaram halos de inibição contra todas as bactérias Gram-positivas: *B. cereus* CBAM 0549 (baixa sensibilidade a *T. crassum* e média sensibilidade para *Trichoderma* sp.), *S. epidermidis* CBAM 0614 (média sensibilidade para *T. crassum* e alta sensibilidade para *Trichoderma* sp.) e *S. aureus* CBAM 0629 (média sensibilidade contra ambas as linhagens).

Dentre as bactérias Gram-negativas, apenas duas cepas foram inibidas: *E. coli* CBAM 0001 (média sensibilidade a as duas linhagens) e *K. pneumoniae* CBAM 0672 (baixa sensibilidade a *T. crassum* e média sensibilidade a *Trichoderma* sp.). Entretanto, a cepa de *P. aeruginosa* CBAM 0665 não apresentou nenhuma sensibilidade a *T. crassum* (CFAM 0235) e nem a *Trichoderma* sp. CFAM 0767 durante a avaliação dos experimentos.

*Trichoderma crassum* foi descrito pela primeira vez na literatura por Bissett (1991), após a identificação de microrganismos isolados em solos florestais no Canadá. Mas, não foram encontradas na literatura, informações sobre os potenciais biotecnológicos desta espécie, pois os trabalhos que fazem referência a *T. crassum* são de diversidade biológica que têm como objetivo, descrever a ocorrência da espécie em determinadas regiões (BISSETT, 1991; CHAVERRI *et al*, 2003; HOYOS-CARVAJAL *et al*, 2009 e LÓPEZ *et al*, 2012).

Entretanto, em estudos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa, Oliveira (2019) avaliou o potencial antibacteriano, através da técnica do bloco de gelose por difusão em ágar, da linhagem *T. crassum* (CFAM 0235) contra dez cepas de *S. aureus*. Das dez linhagens testadas, nove foram inibidas por este fungo, apresentando diferentes tamanhos de halos de inibição, os quais as médias variaram entre 2,37 a 7,17 mm. Com base nisto e com os resultados obtidos nesta pesquisa, observamos que a linhagem *T. crassum* (CFAM 0235) apresenta potencial antibacteriano e é eficiente contra cinco das seis bactérias avaliadas neste estudo.

Dentre as linhagens testadas, *Trichoderma* sp. (CFAM 0837) foi a com menor potencial de inibição bacteriana, pois inibiu apenas a cepa de *S. epidermidis* (CBAM 0614) com a média dos halos de inibição de 13,33 mm. No entanto, foi a linhagem que apresentou o maior halo de inibição contra a levedura *C. albicans*, com a média de 19,33 mm. Vale ressaltar que apesar da diferença no tamanho dos halos de inibição, o grau de sensibilidade dos microrganismos a *Trichoderma* sp. (0837) foi considerado médio de acordo com a Tabela 12.

Ainda sobre a atividade antifúngica avaliada neste experimento, observou-se que todas as linhagens de *Trichoderma* foram capazes de inibir a levedura *C. albicans* (CFAM 1186) com diferentes tamanhos de halos de inibição (FIGURA 8), os quais variaram entre 9,33 mm para *T. crassum* (CFAM 0235) a 19,33 mm para a linhagem de *Trichoderma* sp. (CFAM 0837).

Quanto ao grau de sensibilidade de *C. albicans* (CFAM 1186) aos agentes antifúngicos, foram considerados baixo para *T. crassum* (CFAM 0235) e *T. virens* (CFAM 1376) e grau médio para as demais linhagens avaliadas (TABELA 6). Sadykova (2015) também encontrou inibição de crescimento de um dos cinco extratos de *T. harzianum* contra uma cepa padrão de *C. albicans*, com halo de inibição de 26 mm.

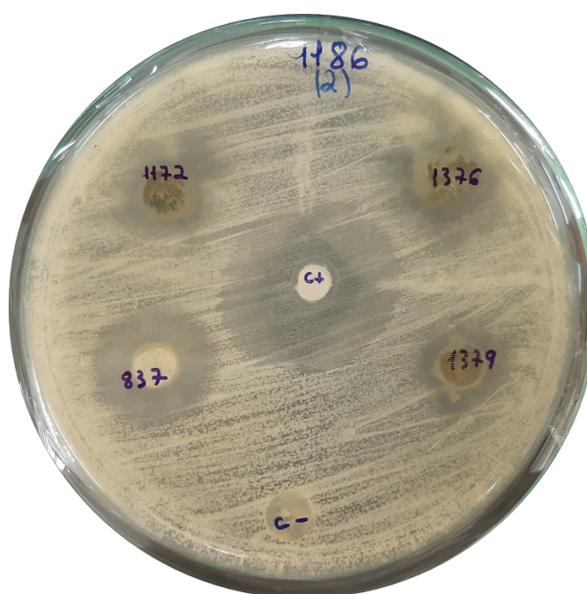


Figura 8 - Diferentes tamanhos de halos de inibição de *Trichoderma* spp. observados no teste do bloco de gelose de *Trichoderma* sp. (CFAM 0837), *T. harzianum* (CFAM 1172) e *T. virens* (CFAM 1376 e CFAM 1379) testados contra *Candida albicans* (CFAM 1186). No centro da placa o controle positivo (C+) com Itraconazol e abaixo o controle negativo (C-) apenas com o bloco de ágar  
Fonte: A autora (2020).

Contudo, nesta avaliação, nenhuma linhagem de *Trichoderma* foi capaz de inibir o fungo filamentosso *A. niger* (CFAM 050). Dados diferentes foram encontrados por Sadykova (2017), que ao avaliar cinco extratos de *T. harzianum* contra cinco espécies de *Aspergillus*, dentre elas uma linhagem de *A. niger*, observou que quatro extratos foram capazes de inibir *A. niger* com halos que variaram de 11 a 31 mm. A diferença nos resultados encontrados entre linhagens da mesma espécie pode acontecer por causa da diversidade biológica e genética que

existe dentro das espécies, o que pode gerar diferentes graus de sensibilidade ao agente antimicrobiano (RAMOS; SAID, 2011).

Fazendo um comparativo geral entre as médias dos halos de inibição e conseqüentemente, o grau de sensibilidade dos microorganismos-teste às linhagens de *Trichoderma*, foi possível observar que mais da metade dos microorganismos, ou seja, 58% apresentaram sensibilidade média ao agente antimicrobiano, seguido de 25% com ausência de sensibilidade, 13% que demonstraram baixa sensibilidade e apenas 4% que se mostraram altamente sensíveis às linhagens de *Trichoderma* (FIGURA 9).

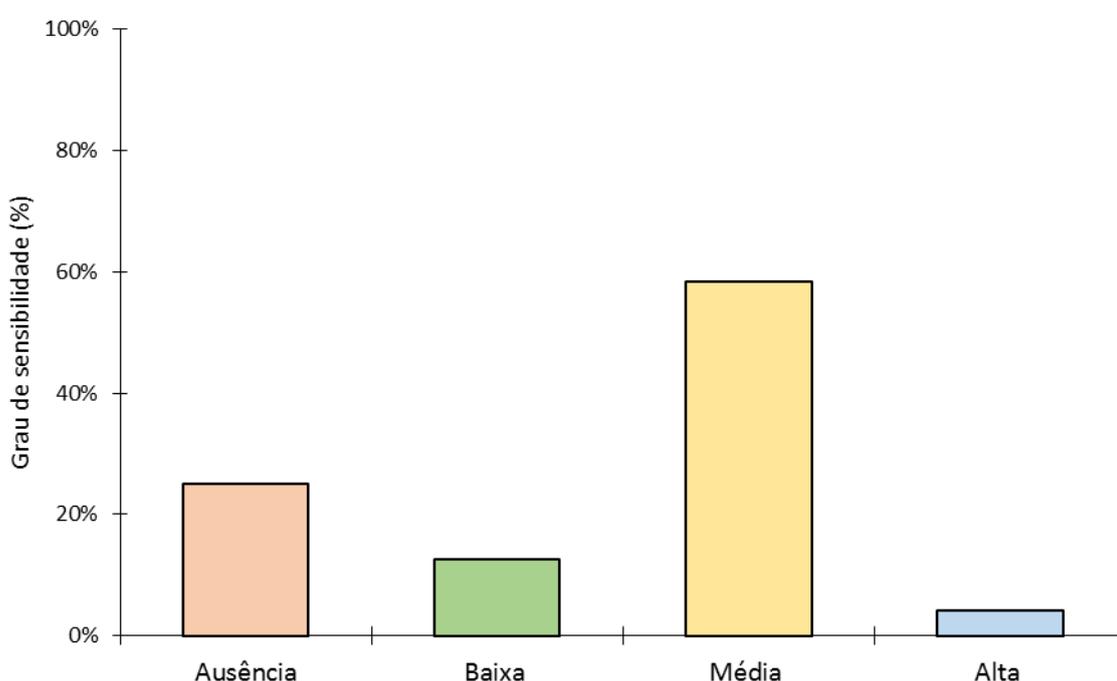


Figura 9 – Grau de sensibilidade dos microorganismos testados contra as linhagens de *Trichoderma*. Ausência sensibilidade: microrganismo que na leitura do teste do bloco de gelose não apresentaram halos de inibição na superfície da placa de ágar; Baixa sensibilidade: halos com até 12 mm; Média sensibilidade: halos no intervalo de 13 até 29 mm e Alta sensibilidade: halos de inibição a partir de 30 mm.

Fonte: A autora (2020).

Neste teste inicial do bloco de gelose, consideramos linhagens bioativas aquelas que apresentaram atividade antimicrobiana a pelo menos um dos oito microorganismos avaliados. Apesar da variação nos tamanhos dos halos de inibição de *Trichoderma* spp. encontrados nestes resultados, halos maiores não indicam um poder de ação antimicrobiana maior, assim como halos menores não indicam um menor potencial de inibição. Uma vez que, o tamanho do halo formado na superfície da placa com ágar está relacionado com o peso molecular e a velocidade de difusão dos compostos antimicrobianos (BONA *et al*, 2014).

Da mesma forma, não podemos afirmar que a ausência da formação do halo de inibição está relacionada exclusivamente com a ausência da atividade antimicrobiana da linhagem testada. Isso pode acontecer por causa da difusão lenta ou incompleta dos compostos, como é o caso dos compostos menos polares, pois estes se difundem mais lentamente no meio de cultura (BONA et al, 2014).

Assim, a seleção das linhagens para o cultivo submerso não foi realizada somente com base no tamanho dos halos e quantidade de microrganismos inibidos pelas linhagens. Foram levados em consideração os dados obtidos em testes anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa, os quais indicaram as linhagens *T. crassum* (CFAM 235), *Trichoderma* sp. (CFAM 767) e *T. harzianum* (CFAM 1172) como as mais promissoras para prosseguir nos estudos da atividade antimicrobiana.

## 5.2 Obtenção dos extratos metabólicos de *Trichoderma*

As três linhagens selecionadas foram cultivadas nos meios líquidos BD e FT para a obtenção dos extratos metabólicos dos fungos selecionados. Após a extração química com acetato de etila - AcOEt, foi obtido um total de doze extratos, quatro de cada fungo, sendo dois provenientes do meio de cultura fermentado e dois advindos da biomassa do micélio seco (FIGURA 10).



Figura 10 – Extratos brutos das linhagens de *Trichoderma* obtidos com acetato de etila  
Fonte: A autora (2020).

O acetato de etila é um solvente de média polaridade, baixa toxicidade celular e é amplamente utilizado em estudos que visam prospectar substâncias bioativas, pois é capaz de

extrair substâncias polares e apolares, inclusive aquelas provenientes do metabolismo secundário de microrganismos, além disso possui baixo custo quando comparado a solventes de polaridade semelhante (RIBEIRO, 2015).

Dentre os extratos obtidos da biomassa micelial, os extratos 1172 FM do fungo *T. harzianum* (CFAM 1172) cultivado no meio FT e o extrato 235 BM da linhagem *T. crassum* (CFAM 0235) cultivado em meio BD, apresentaram as maiores porcentagens de rendimento 6,95 e 5,35%, respectivamente. Por outro lado, o extrato 767 FM obtido do fungo *Trichoderma* sp. (CFAM 0767) cultivado no meio FT, apresentou o menor rendimento (0,65%) entre os extratos do micélio (TABELA 13).

Tabela 13 – Rendimentos dos extratos de *Trichoderma* spp. obtidos do cultivo submerso em 1 L nos meios BD e FT. Os extratos foram extraídos da biomassa micelial através do solvente AcOEt.

Espécies	Meio de cultura	Identificação do extrato	***Biomassa do micélio seco (g)	****Massa do extrato bruto (g)	Rendimento do extrato (%)
<i>T. crassum</i> (CFAM 0235)	*BD	235 BM	6,504	0,348	5,35%
	**FT	235 FM	9,066	0,237	2,61%
<i>Trichoderma</i> sp. (CFAM 0767)	BD	767 BM	14,052	0,106	0,75%
	FT	767 FM	15,800	0,104	0,65%
<i>T. harzianum</i> (CFAM 1172)	BD	1172 BM	6,899	0,183	2,65%
	FT	1172 FM	6,157	0,428	6,95%

\*BD = Meio Batata Dextose (modificado com 2 g de extrato de levedura); \*\*FT= Meio Farelo de trigo;

\*\*\*Biomassa do micélio pesado após secagem completa na estufa; \*\*\*\*Massa do extrato bruto obtida após o processo de extração química com AcOEt.

Com base nos resultados descritos na Tabela 13, observou-se que os fungos que produziram maiores quantidades da biomassa do micélio seco, não foram os que proporcionaram maiores rendimentos na massa do extrato bruto. Como foi o caso do extrato 767 FM, da linhagem *Trichoderma* sp. (CFAM 0767) cultivado em meio FT, pois este apresentou a maior quantidade de biomassa do micélio seco com 15,800 g, no entanto a massa do extrato bruto foi a menor com 0,104 g, ou seja, a menor porcentagem de rendimento entre os extratos obtidos com 0,65%. Seguido do extrato 767 BM, também da linhagem CFAM 0767 cultivado no meio BD, que apresentou a segunda maior quantidade de biomassa do micélio seco com 14,052 g, contudo a massa obtida deste extrato foi de 0,106 g o que equivale a apenas 0,75% de rendimento. No entanto, o extrato 1172 FM descrito anteriormente como o com maior rendimento 6,95% entre os extratos da biomassa micelial, foi o que apresentou menor quantidade da biomassa do micélio seco com 6,157 g.

Isso pode acontecer devido à diferença fisiológica dos fungos em resposta às condições de cultivo os quais foram testados ou ainda pelo solvente extrator, que neste trabalho foi utilizado apenas o acetato de etila, um solvente intermediário.

Para a avaliação dos rendimentos do extratos obtidos a partir do caldo de cultivo fermentado, foram considerados apenas a quantidade de massa do extrato bruto em AcOEt, identificada após a secagem completa do solvente e pesagem em balança analítica.

Os extratos que apresentaram maiores rendimentos foram o 767 BE do fungo *Trichoderma* sp. (CFAM 0767) cultivado em meio BD, com rendimento de 0,277 g e o extrato 1172 FE da linhagem *T. harzianum* (CFAM 1172) cultivado em meio FT com 0,224 g. Seguido do extrato 767 FE do *Trichoderma* sp. (CFAM 0767) cultivado em meio FT com 0,214 g e o extrato 235 FE do fungo *T. crassum* (CFAM 0235) cultivado em meio FT com 0,113 g.

Os extratos que apresentaram os menores rendimentos da massa do extrato bruto foram os 1172 BE da *T. harzianum* (CFAM 1172) cultivado em meio BD e o extrato 235 BE da linhagem *T. crassum* (CFAM 0235) também cultivado em meio BD apresentando os rendimentos de 0,044 g e 0,037 g, respectivamente (TABELA 14).

Tabela 14 – Rendimentos dos extratos de *Trichoderma* spp. obtidos do cultivo submerso em 1 L nos meios BD e FT. Os extratos foram obtidos do caldo de cultivo através do solvente AcOEt

Espécies	Meio de cultura	Identificação do extrato	Massa do extrato bruto (rendimento em g)
<i>T. crassum</i> (CFAM 0235)	BD*	235 BE	0,037
	FT**	235 FE	0,113
<i>Trichoderma</i> sp. (CFAM 0767)	BD	767 BE	0,277
	FT	767 FE	0,214
<i>T. harzianum</i> (CFAM 1172)	BD	1172 BE	0,044
	FT	1172 FE	0,224

\*BD = Meio Batata Dextrose (modificado com 2 g de extrato de levedura),

\*\*FT= Meio Farelo de trigo.

Apesar da variação na quantidade e rendimento da massa dos extratos obtidos, estes foram considerados suficientes para realizar as etapas propostas nesta pesquisa, visto que os fungos foram cultivados em baixa escala, apenas 1 L para cada meio de cultura.

### 5.3 Concentração Mínima Inibitória - CMI

Todos os extratos foram avaliados no teste de microdiluição em placas de 96 poços (FIGURA 11) para a determinação da concentração mínima inibitória dos extratos brutos contra as seis bactérias: *E. coli* (CBAM 0001), *B. cereus* (CBAM 0549), *S. epidermidis* (CBAM 0614), *S. aureus* (CBAM 0629), *P. aeruginosa* (CBAM 0665), *K. pneumoniae* (CBAM 0672) e a levedura *C. albicans* (CFAM 1186). No entanto, o fungo filamentoso *A. niger* (CFAM 050) não seguiu nos testes antimicrobianos, pois não apresentou sensibilidade a nenhuma linhagem de *Trichoderma* no teste do bloco de gelose.

O valor da CMI foi de  $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$  para as bactérias, identificados em oito dos doze extratos avaliados: 235 BE, 235 BM, 767 BE, 767 FE, 767 BM, 767 FM, 1172 FE e 1172 FM, ou seja, as três linhagens de *Trichoderma* avaliadas neste estudo, foram capazes de produzir extratos bioativos, com atividade antibacteriana em baixa concentração, contra uma ou duas cepas de bactérias de interesse médico. No entanto, a CMI identificada para a levedura *C. albicans* (CFAM 1186) foi de  $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$  observada nos extratos 235 BE e 235 BM, 767 FE e 767 FM de acordo com a Tabela 15.

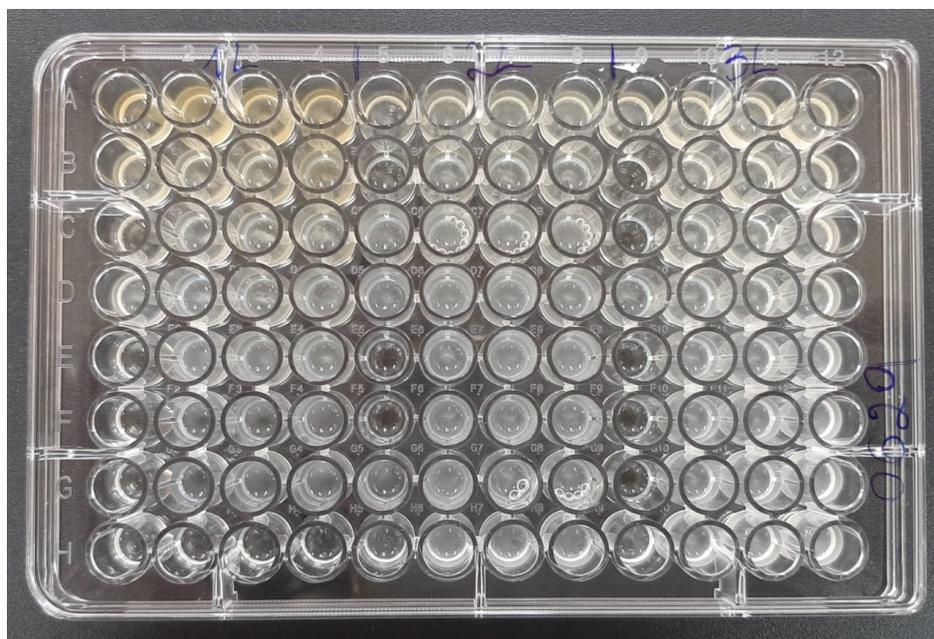


Figura 11– Concentração mínima inibitória dos extratos de *Trichoderma* spp. contra *Staphylococcus aureus* (CBAM 0629). CMI dos extratos: 235 BE (colunas 1-4), 235 FE (5-8) e 767 BD (9-12). Linha H = controles positivo e negativo.  
Fonte: A autora (2020).

Tabela 15 - Identificação da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *Trichoderma* spp. contra as bactérias e a levedura

Fungo	----- <i>T. crassum</i> -----				----- <i>Trichoderma</i> sp. -----				----- <i>T. harzianum</i> -----			
	CFAM 0235	CFAM 0235	CFAM 0235	CFAM 0235	CFAM 0767	CFAM 0767	CFAM 0767	CFAM 0767	CFAM 1172	CFAM 1172	CFAM 1172	CFAM 1172
Extrato	235 BE	235 FE	235 BM	235 FM	767 BE	767 FE	767 BM	767 FM	1172 BE	1172 FE	1172 BM	1172 FM
Microrganismos	----- CMI (mg.mL <sup>-1</sup> ) -----											
<i>E. coli</i> (CBAM 0001)	R	0,12	0,03	0,12	0,03	0,06	0,03	0,03	R	0,03	0,12	0,03
<i>B. cereus</i> (CBAM 0549)	1,00	2,00	R	R	1,00	0,03	R	R	1,00	1,00	0,12	0,03
<i>S. epidermidis</i> (CBAM 0614)	0,50	1,00	0,06	0,06	1,00	0,50	0,06	0,50	0,50	2,00	0,50	2,00
<i>S. aureus</i> (CBAM 0629)	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>P. aeruginosa</i> (CBAM 0665)	0,03	R	R	R	R	0,03	R	0,50	R	1,00	0,50	0,50
<i>K. pneumoniae</i> (CBAM 0672)	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>C. albicans</i> (CFAM 1186)	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00

R= resistente (não houve inibição do crescimento nas concentrações avaliadas).

Os extratos 235 BE e 767 FE foram ativos contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* (CBAM 0665) com a concentração mínima de  $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ , assim como os extratos 1172 FTM e o 767 FE que inibiram a bactéria Gram-positiva *B. cereus* (CBAM 0549) com a mesma concentração.

Resultados similares foram observados nos extratos 235 BM, 767 BE, 767 BM, 767 FM 1172 FE e 1172 FTM, uma vez que todos apresentaram a CMI contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* (CBAM 0001). Dentre os extratos citados, podemos destacar os extratos 767 FE que apresentou a CMI contra duas bactérias: *B. cereus* e *P. aeruginosa*, ambas Gram-positivas e o 1172 FTM que apresentou CMI contra uma bactéria Gram-positiva *B. cereus* (CBAM 0549) e uma Gram-negativa *E. coli* (CBAM 0001).

Vale ressaltar que dentre os microrganismos analisados no teste de microdiluição, a bactéria *E. coli* (CBAM 0001) apresentou suscetibilidade a metade dos extratos na concentração de  $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ , mas apresentou resistência nas concentrações avaliadas a dois extratos: 235 BE e 1172 BE, ambos cultivados em meio BD e extraídos do caldo de cultura fermentado. Diferente da cepa de *P. aeruginosa* (CFAM 0665), que mesmo apresentando sensibilidade aos extratos 235 BE e 767 FE na concentração mínima de  $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ , demonstrou resistência à metade dos extratos nas concentrações avaliadas.

Da mesma forma *B. cereus* (CBAM 0549) foi inibido com a CMI por dois extratos: 767 FE e 1172 FM, mas se mostrou resistente nas concentrações avaliadas a quatro dos doze extratos testados. Por outro lado, a levedura *C. albicans* (CFAM 1186) mesmo com a CMI maior do que as identificadas para as bactérias, não demonstrou resistência a nenhum extrato das linhagens de *Trichoderma*.

Narendran e Kathiresan (2016) isolaram *Trichoderma* sp. da rizosfera de *Rhizophora annamalayana* coletada da floresta de mangue Pichavaram na Índia. O extrato bruto do fungo foi extraído com acetato de etila após 28 dias de cultivo em BD e seu potencial antibacteriano foi testado contra seis bactérias patogênicas, dentre elas *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*. A CMI identificada neste estudo foi de  $150 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *B. cereus* e *S. aureus*, e  $125 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *E. coli*.

Neste sentido Leylaie e Zafari (2017) isolaram as espécies *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. koningiopsis* e *T. longibrachiatum* de plantas vincas encontradas no Irã. As linhagens foram cultivadas em meio BD durante duas semanas para a obtenção dos extratos metabólicos. Os extratos de metanol e acetato de etila foram testados quanto a sua atividade antibacteriana contra quatro bactérias dentre elas *S. aureus* e *E. coli*. Os extratos de

acetato de etila demonstraram a valor da CMI no intervalo de 7,8-15,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que os extratos obtidos com metanol apresentaram a CMI no intervalo de 7,8-32,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Hurman et al. (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos dos fungos *T. viride* e *T. stromaticum*, extraídos com diclorometano, contra sete microrganismos patogênicos. A CMI foi expressa em porcentagem, com destaque para *E. coli* com a CMI de 25% para o extrato de *T. viride* e 3,125% de *T. stromaticum*. Entretanto, para a *C. albicans* a CMI foi de 6,25% para o extrato obtido de *T. viride* e 50% para o extrato de *T. stromaticum*.

Com base nos resultados encontrados nos trabalhos acima citados, podemos observar que os valores da CMI identificados nesta pesquisa foram menores do que os relatados nas literaturas. Isso pode acontecer devido às condições de cultivo utilizadas e ao solvente empregado para a obtenção dos extratos brutos, uma vez que tais fatores podem influenciar diretamente nos resultados obtidos (OLIVEIRA, 2019).

#### **5.4 Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima**

A concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas a partir dos resultados obtidos no teste da CMI (FIGURA 12). Desta forma, foram obtidos o valor da CBM de 0,03  $\text{mg.mL}^{-1}$  para o extrato 767 FE contra as bactérias *B. cereus* (CBAM 0549) e *P. aeruginosa* (CBAM 0665), ambas Gram-positivas (TABELA 16).

Valores diferentes foram encontrados por Leylaie e Zafari (2017) que ao analisarem a CBM dos extratos de acetato de etila e metanol extraídos das linhagens *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. koningiopsis* e *T. longibrachiatum*, contra as bactérias Gram-positivas *Clavibacter michiganensis*, *S. aureus* e as bactérias Gram-negativas *Ralstonia solanacearum* e *E. coli* obtiveram as menores concentrações bactericidas no intervalo de 15,6 - 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além disso, os autores relataram a eficiência antimicrobiana dos extratos obtidos com acetato de etila quando comparado aos extratos de metanol, demonstrando que os solventes utilizados para a obtenção dos compostos biativos podem influenciar nos resultados da CBM e CFM.



Figura 12 – Concentração bactericida mínima dos extratos de *Trichoderma* spp. (767 FE e 1172 BE) contra *Staphylococcus epidermidis* (CBAM 0614).  
Fonte: A autora (2020).

Resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa foram relatados por Oliveira (2019) após analisar a CBM de seis filtrados de *Trichoderma* spp. cultivados sob diferentes condições de cultivo. Testados contra nove cepas de *S. aureus*, incluindo uma cepa padrão ATCC 80958, os valores da CBM variaram entre  $0,94 \text{ mg.mL}^{-1}$  a  $>7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os dados demonstraram que as diferentes condições utilizadas no cultivo de *Trichoderma* spp., principalmente a luminosidade, interferiu nos valores da CBM encontrados entre a mesma linhagem de *Trichoderma* sp.

A CFM identificada neste estudo foi de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  do extrato 767 FE (TABELA 15), contra a levedura *C. albicans* (CFAM 1186), corroborando com os resultados encontrados por Cortez et al. (2015) que ao avaliar a CFM dos óleos essenciais de *Lippia alba* e *Cymbopogon citratus* isolados e a mistura dos dois identificaram a CFM de  $0,500$  e  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  contra as cepas padrão de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. paraplisisis*.

Morais et al. (2020) avaliaram a CFM dos extratos etéreos obtidos dos frutos verdes e maduros da *Solanum lycocarpum* e do antifúngico cetoconazol contra *C. albicans* e *C. krusei*. Os extratos etéreos apresentaram a CFM superior a  $2000 \text{ mg.mL}^{-1}$  para as duas espécies de

*Candida*. No entanto, a combinação entre o extrato dos frutos verdes e o antifúngico apresentaram CFM de  $500 \text{ mg.mL}^{-1}$  para a *C. albicans* e  $1000 \text{ mg.mL}^{-1}$  para a *C. krusei*. Diferente da análise realizada entre o extrato dos frutos maduros e o cetoconazol, pois estes apresentaram CFM de  $15 \text{ }\mu\text{g/mL}$  para a *C. albicans* e superior a  $2000 \text{ }\mu\text{g/mL}$  para a *C. krusei*.

Tabela 16 - Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos de *Trichoderma* spp. contra as bactérias e a levedura

Fungos	----- <i>T. crassum</i> -----				----- <i>Trichoderma</i> sp. -----				----- <i>T. harzianum</i> -----			
	CFAM 0235	CFAM 0235	CFAM 0235	CFAM 0235	CFAM 0767	CFAM 0767	CFAM 0767	CFAM 0767	CFAM 1172	CFAM 1172	CFAM 1172	CFAM 1172
Extratos	235 BE	235 FE	235 BM	235 FM	767 BE	767 FE	767 BM	767 FM	1172 BE	1172 FE	1172 BM	1172 FM
Microorganismos	----- CBM/CFM (mg.mL <sup>-1</sup> ) -----											
<i>E. coli</i> (CBAM 0001)	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00
<i>B. cereus</i> (CBAM 0549)	1,00	2,00	> 2,00	> 2,00	1,00	0,03	2,00	> 2,00	0,50	1,00	> 2,00	> 2,00
<i>S. epidermidis</i> (CBAM 0614)	0,50	1,00	0,06	0,06	1,00	0,50	0,06	> 2,00	0,50	> 2,00	> 2,00	> 2,00
<i>S. aureus</i> (CBAM 0629)	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00
<i>P. aeruginosa</i> (CBAM 0665)	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	0,03	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00
<i>K. pneumoniae</i> (CBAM 0672)	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	0,25	> 2,00	> 2,00	> 2,00
<i>C. albicans</i> (CFAM 1186)	> 2,00	2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	1,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00	> 2,00

Fonte: A autora (2020).

### 5.5 Bioensaio de toxicidade dos extratos de *Trichoderma* spp. com náuplios de *Artemia salina*

Os doze extratos obtidos das linhagens de *Trichoderma* spp. foram avaliados quanto à sua toxicidade em náuplios de *A. salina* nas seguintes concentrações: 700, 500, 250 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As leituras foram realizadas após 24 e 48 h de incubação e os indivíduos que não apresentaram movimento no momento da leitura foram considerados mortos.

A maioria dos extratos (8): 235 BE, 235 BM, 235 FM, 767 BE, 767 BM, 767 FE; 1172 BM e 1172 BM não apresentaram mortalidade a nenhum náuplio de *A. salina*, ou seja, a porcentagem de indivíduos vivos após as 24 h de incubação nas diferentes concentrações foi de 100%. No entanto, após a leitura de 48 h, observou-se que dez dos doze extratos causaram mortalidade em pelo menos uma das quatro concentrações avaliadas (TABELAS 17, 18 e 19).

Tabela 17 – Teste de toxicidade dos extratos obtidos do fungo *Trichoderma crassum* (CFAM 0235) com náuplios de *Artemia salina*.

Extratos	Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Indivíduos mortos após o período de incubação			
		M e DP <sup>1</sup>		% <sup>2</sup>	
		24 h	24 h	48 h	48 h
235 BE	0*	0	0%	0	0%
235 BE	700	0	0%	0	0%
235 BE	500	0	0%	0	0%
235 BE	250	0	0%	0	0%
235 BE	125	0	0%	0	0%
235 FE	0	0	0%	0	0%
235 FE	700	0	0%	0.5±0.5	5%
235 FE	500	0	0%	1.7±1.2	17%
235 FE	250	0	0%	2.5±1.8	27%
235 FE	125	0	0%	0.3±0.5	3%
235 BM	0	0	0%	0	0%
235 BM	700	0	0%	0	0%
235 BM	500	0	0%	0.3±0.5	3%
235 BM	250	0	0%	0	0%
235 BM	125	0	0%	0.3±0.5	3%
235 FM	0	0	0%	0	0%
235 FM	700	0	0%	0	0%
235 FM	500	0.2±0.4	2%	0.2±0.4	2%
235 FM	250	0	0%	0	0%
235 FM	125	0	0%	0	0%

<sup>1</sup> M e DP = Média e desvio padrão de indivíduos mortos após a leitura; <sup>2</sup> % = porcentagens de mortalidade; \*0 = Controle.

Tabela 18 – Teste de toxicidade dos extratos obtidos do fungo *Trichoderma sp.* (CFAM 0767) com náuplios de *Artemia salina*.

Extratos	Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Indivíduos mortos após o período de incubação			
		M e DP <sup>1</sup>		M e DP <sup>2</sup>	
		24 h	% <sup>1</sup>	48 h	% <sup>2</sup>
767 BE	0	0	0%	0	0%
767 BE	700	0	0%	0	0%
767 BE	500	0	0%	0.5±0.5	5%
767 BE	250	0	0%	0	0%
767 BE	125	0	0%	0.3±0.5	3%
767 FE	0	0	0%	0	0%
767 FE	700	0	0%	0.3±0.5	3%
767 FE	500	0	0%	0.2±0.4	2%
767 FE	250	0	0%	4.5±3.3	45%
767 FE	125	0	0%	0.2±0.4	2%
767 BM	0	0	0%	0	0%
767 BM	700	0	0%	0	0%
767 BM	500	0	0%	0.2±0.4	2%
767 BM	250	0	0%	0	0%
767 BM	125	0	0%	0	0%
767 FM	0	0	0%	0	0%
767 FM	700	0	0%	0	0%
767 FM	500	0.3±0.5	3%	0.2±0.4	2%
767 FM	250	0	0%	0	0%
767 FM	125	0	0%	0	0%

<sup>1</sup> M e DP = Média e desvio padrão de indivíduos mortos após a leitura; <sup>2</sup> % = porcentagens de mortalidade; \*0 = Controle.

Tabela 19 – Teste de toxicidade dos extratos obtidos do fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1172) com náuplios de *Artemia salina*.

Extratos	Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Indivíduos mortos após o período de incubação			
		M e DP <sup>1</sup>		M e DP <sup>2</sup>	
		24 h	% <sup>1</sup>	48 h	% <sup>2</sup>
1172 BE	0	0	0%	0	0%
1172 BE	700	0	0%	0	0%
1172 BE	500	0	0%	0	0%
1172 BE	250	0	0%	0	0%
1172 BE	125	0	0%	0	0%
1172 FE	0	0	0%	0	0%
1172 FE	700	0.2±0.4	2%	4.7±3.0	47%
1172 FE	500	0	0%	3.2±2.0	32%
1172 FE	250	0	0%	7.2±3.2	28%
1172 FE	125	0	0%	0	0%
1172 BM	0	0	0%	0	0%
1172 BM	700	0	0%	0	0%
1172 BM	500	0	0%	0	0%
1172 BM	250	0	0%	0	0%
1172 BM	125	0	0%	0	0%
1172 FM	0	0	0%	0	0%
1172 FM	700	0	0%	0	0%
1172 FM	500	0.5±0.5	5%	0.5±0.5	5%
1172 FM	250	0	0%	0.3±0.5	3%
1172 FM	125	0	0%	0.5±0.5	5%

<sup>1</sup> M e DP = Média e desvio padrão de indivíduos mortos após a leitura; <sup>2</sup> % = porcentagens de mortalidade; \*0 = Controle

Com relação ao período de incubação, nota-se que os indivíduos incubados durante 24 h apresentaram as menores porcentagens de mortalidade (0 a 5%), indicando que os extratos avaliados nas quatro concentrações não foram tóxicos a *A. salina* durante esse período de exposição. No entanto, resultados diferentes foram observados com os indivíduos incubados por 48 h, pois a porcentagem de mortalidade variou de 0 a 47%.

Mesmo com essa variação na porcentagem de mortalidade, o grau de toxicidade contra *A. salina* foi classificado, de acordo com a metodologia adotada neste trabalho, em não tóxico (NT) e ligeiramente tóxico (LT). Portanto, observa-se que nenhum extrato de *Trichoderma* spp. avaliados nas quatro concentrações: 700, 500, 250 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi considerado tóxico e/ou altamente tóxico a *A. salina*. Por isso, não foi possível determinar a concentração letal média (CL 50) dos extratos metabólicos de *Trichoderma* spp.

Os extratos classificados como LT: 235 FE; 767 FE e 1172 FE foram todos cultivados no meio farelo de trigo e extraídos quimicamente do caldo de cultura fermentado. Um fato interessante foi observado com os indivíduos avaliados nestes poços-teste; os náuplios mortos ficaram na superfície da placa, diferente do náuplios mortos nos demais poços, onde os indivíduos ficaram no fundo dos poços, de acordo com as descrições nas literaturas. Assim, acredita-se que o meio de cultura pode ter influenciado de alguma forma na toxicidade desses extratos contra *A. salina*. Entretanto, não se sabe o que pode ter acontecido, por isso é importante que mais pesquisas sejam realizadas com esses extratos para que sejam identificados os fatores que possam ter influenciado nos resultados encontrados nesta pesquisa.

Meyer et al. (1982) realizaram um estudo de toxicidade com extratos de plantas em náuplios de *A. salina* e a partir disso, estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL50. Desde então, este estudo tem servido de base para experimentos que visam realizar uma análise inicial de toxicidade de diversas substâncias ou compostos de origem natural. A utilização de *A. salina* é uma alternativa aos testes com ratos, pois é um teste relativamente simples, rápido, de fácil manipulação em laboratório, baixo custo econômico e principalmente por demonstrar correlação com diversas atividades biológicas como antitumoral e antimicrobiana (CALOW, 1993; LIMA et al, 2014).

## 6 CONCLUSÕES

As seis linhagens de *Trichoderma*: *T. crassum* (1), *T. harzianum* (1), *T. virens* (2) e *Trichoderma* sp. (2) produziram compostos antimicrobianos capazes de inibir pelo menos uma das seis bactérias testadas.

Todas as linhagens foram ativas contra a levedura *C. albicans*, mas nenhuma linhagem conseguiu inibir o crescimento do fungo filamentoso *A. niger*.

O extrato 767 FE do fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0767, cultivado em meio FT, mostrou-se como o mais promissor, apresentando os menores valores de concentração inibitória, bactericida mínima e fungicida mínima.

Os doze extratos das linhagens de *Trichoderma* avaliados em náuplios de *A. salina* não se mostraram tóxicos nas concentrações testadas, por isso não foi possível identificar as suas CL<sub>50</sub>.

As linhagens de *Trichoderma* avaliadas neste trabalho são promissoras, pois apresentaram atividade antimicrobiana eficiente contra os microrganismos patogênicos/opportunistas testados e não apresentaram toxicidade nos testes preliminares com os microcrustáceos *A. salina*.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S. *et al.* Fungos de Interesse: aplicações Biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 55-59, jan./mar. 2015.
- ALANGADEN, G.J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, p. 201-225, 2011.
- ALHAZMI, A. *Pseudomonas aeruginosa*-Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. **International Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 44, 2015.
- ALEXOPOULOS, C. J. *et al.* **Introductory Mycology**. 4ed. New York: John Wiley Sons, 1996.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 12 Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: relatório de resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmado laboratorialmente associadas a cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva (2014)**. Brasília: Ministério da saúde, 2015.
- ASH, C. *et al.* Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal System. Bacteriol**, v. 41, p. 343-346, 1991.
- BARNES, P.D.; MARR, K.A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 545-561, 2006.
- BASSET, P. *et al.* The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: TIBAYRENC, M. (ed.). **Genetics and Evolution of Infectious Disease**. London: Elsevier, 2011. p. 669-688.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (ed.). **Aspergillus Molecular Biology and Genomics**. Linton: Caister Academic Press, 2010. p. 1-16.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. **Canadian Journal of Botany**, v.62, n.5, p.924-31, 1984.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium JOHN. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 2373-2417, 1991.
- BOMFIM, M. P. *et al.* Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma spp.* a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathol**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.
- 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.

BONONI, V. L. R. Zigomycetes, Basidiomycetes, e Deuteromycetes: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. In: GRANDI, R. A. P. (ed.). **Taxonomia de deuteromycetos**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1999. v. 1. p.141-160.

BOPP, C.A. *et al.* *Escherichia coli* and *Salmonella*. In MURRAY, P.R. *et al.*(ed.) Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press, 1999. p. 459-465.

BOTTONE E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 382-398, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria MS 2.616/98, de 12 de maio de 1998**. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país em substituição a Portaria MS 930/92. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616\\_12\\_05\\_1998.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html). Acesso em: 20 dez. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância em Sanitária-ANVISA. **Deteção e identificação dos fungos de importância médica**. Modulo VII. Brasília: ANVISA, 2004. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/microbiologia/mod_7_2004.pdf). Acesso em: 22 dez. 2020.

BRITO, J. P. C. *et al.* Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. **SpringerPlus**, v.3, n. 600, p. 1-1, 2014.

BITRUS, A.A. *et al.* Dissemination of resistance and virulence determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during colonization and disease: a review. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 6, n. 1, p. 44-54, 2018.

CASTÓN-OSORIO, J.J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. Epidemiology of invasive fungal infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 2, p. S103-S109, nov. 2008. Supl.2.

CALOW, P. **Marine and estuarine invertebrate toxicity tests**. In: HOFFMAN, D. *et al.* Handbook in cytotoxicology. Oxford: Blackwell Scientific Publication, v. 1, p. 1-5, 1993.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 4, p. 1- 11, 2016.

CHAPLA, M. V. **Bioprospeção dos fungos endofíticos associados a espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp.** 2014. 251 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

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

CHAVES, J. Q.; PIRES, E. S.; VIVONI, A. M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 12-16, 2011.

CHAVES, J. Q. *et al.* Molecular Characterization and Risk Assessment of *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolated from Ultrahigh-Temperature and Pasteurized Milk Marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 80, p. 1060-1065, 2017.

CHIAVEGATTI, B. *et al.* Cogumelos Comestíveis: Produção e Mercado Brasileiros. Instituto de Biociência da USP. 2018.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CORREA, P.C. *et al.* Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 1, n. 4, p. 177-181, 2009.

CRAFT, K. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **Medicinal Chemistry Communication**, v.10, n.8, p.1231-1241, aug. 2019

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Natural products in drug discovery: Recent advances. In: CECHINEL-FILHO, V. (ed.). **Plant Bioactives and Drug Discovery: principles, practice, and perspectives**. 4 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. CLSI document M07-A6. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.

\_\_\_\_\_. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - ninth edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

DANIELSON, R.M.; DAVEY, C.B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.485-94, 1973.

DAVID, C. M. N. Infecção em UTI. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.31, n.3, p. 337-348. 1998.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, p. 417-433, 2010.

DRUZHININA, I. S. *et al.* Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. **Microbiology**, v. 154, p. 3447-3459, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997

EIFF, C.V.; PROCTOR, R.A.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci: pathogens have major role in nosocomial infections. **Postgraduate Medicine**, v.110, n.4, p.63-76, oct. 2001.

EIFF, C.V.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, n.11, p. 677-685, nov. 2002.

EGOROV, N.S., **Osnovy ucheniya ob antibiotika (Fundamentals of the Theory of Antibiotics)**. Moscow: Mosk. Gos. Univ, p.277-281, 2004.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. p.10-44.

FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Strategies for target identification of antimicrobial natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 5, p. 668-680, 2016.

FEITOSA, Y.B. **Avaliação de fatores bióticos e abióticos no crescimento e esporulação de genótipos tropicais de *Trichoderma* spp.** 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2016.

FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

FISCHER, W.C.L. *et al.* Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 21, n.12, p.220, 2012.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Diagnostic microbiology**.12.ed. Saint Louis: Mosby Elsevier, 2007. P.34.

FRITZE, D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1245- 1248, 2004.

GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

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

GARBIN, V. P. **Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius 1824)**. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GRIFFITHS, M.W.; SCHRAFT, H. Bacillus cereus Food Poisoning. In: DODD, C.E.R. *et al.* (ed.). **Foodborne Diseases**, Academic Press, 2017, v.157, n.2, p. 395-405.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 454-500, 1999.

GUEDES, V. R. **Estudo das atividades antimicrobianas dos extratos dos fungos *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *Trichoderma stromaticum* e *Xylaria***

**spp., e estudo químico de exemplares de *Xylaria* spp.** 2011. 274f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* *Bacillus cytotoxicus* sp. is a novel thermotolerante species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 31-40, 2013.

GUMBO, T. Princípios gerais no tratamento antimicrobiano. In: BRUTON, L.L; CHAMBER, B.A; KNOLLAMANN, B.C. (ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12.ed. Porto Alegre: Artemed, 2012. p.1365.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017.

HARMAN, G.E. *et al.* Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**, v. 94, n. 2, p. 146-153, 2004.

HARMAN, G.E. *et al.* *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **BMJ**, v.317, n.7.159, p.657-660, set. 1998.

HENDRIKSEN, N. B. *et al.* Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 239-249, 2006.

HOLANDA, A.A.R. *et al.* Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.1, p.3-9, 2007.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 615-631, 2009.

HURMANN, E.M.S.; POZZOBOM, T.M.H.; MARTINS, C.V.B. Atividade antimicrobiana de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum*. **Brazilian Journal Of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 575-591, 2020.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

JAVAID, A.; ALI, S. Herbicidal activity of culture filtrates of *Trichoderma* spp. against two problematic weeds of wheat. **Natural Product Research**, v. 25, p. 730 – 740, 2011.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

- KHALIFA, A. B. H. *et al.* Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. **Annales de Biologie Clinique**, v. 69, n. 4, p. 393–403, ago. 2011.
- KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 123-140, fev. 2004.
- KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
- KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2010.
- KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.107-117, jan. 2000.
- KUMAR, S. *Trichoderma*: uma arma biológica para gerenciar doenças de plantas e promover a sustentabilidade. **International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, v.3, n.1, p. 1-18, 2013.
- LAI, C. *et al.* Current challenges in the management of invasive fungal infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.14, n.2, p.77–85, abr. 2008.
- LARGETEAU, M. L. *et al.* The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: Biology, cultivation and non-medicinal valorisation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 897–907, 2011.
- LECHNER, S. *et al.* *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. é um novo psicrotolerante espécies do grupo *Bacillus cereus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.1373–1382,1998.
- LEYLAIE, S.; ZAFARI, D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1484, p. 1-16, 2018.
- LIMA, C.M.P. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 832-838, dez. 2014.
- LIU, L. *et al.* Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet**, v.379, n.9832, p.2151-2161, 2012.
- LORITO, M. *et al.* Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p. 6382–6385, 1996.

LÓPEZ, V.S. *et al.* Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. **Revista Mexicana de Micología**, v. 36, p. 17-26, 2012.

LOGAN, N. A.; DEVOS, P. Genus *Bacillus*. In: VOS, P. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2.ed. New York: Springer. 2009. v. 3, p. 21-128.

LOUZADA, G.A.S. *et al.* Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.145-149, 2009.

LUZZAGO, C. *et al.* Clonal diversity, virulence-associated genes and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cavities and soft tissue infections in wild ruminants in Italian Alps. **Veterinary Microbiology**, v.170, n.1, p.157-61, 2014.

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

MARKEY, B. *et al.* **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Mosby Elsevier, 2013.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Microbiologia Média**. Editora Manole Ltda, 2005. p. 39-45.

MCNEIL, S. A. *et al.* Outbreak of Sternal Surgical Site Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa* Traced to a Scrub Nurse with Onychomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 317–323, ago. 2001.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MOHIDDIN, F.A. *et al.* Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? **Plant Pathology Journal**, v. 9, p. 92-102, 2010.

MORAIS, M.G. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica dos frutos verdes e maduros de *solanum lycocarpum* frente à *candida albicans* e *candida krusei*. **Biodiversidade**, v. 11, n. 1, p. 19-27, 2018.

MOREIRA, M. G. **Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze**. 2013.71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

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

MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Trichoderma* Research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 105-129, 2013.

NARENDRAN, R.; KATHIRESAN, K. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove-derived *Trichoderma* species against human and fish pathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 189-194, 2016.

NAKAMURA, L.K. *Bacillus pseudomycooides* sp. Nov. **International Journal of Systematic bacteriology**, v.48, p. 1031-1035, 1998.

NATARO J.P.; KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, jan. 1998.

NETO, J. J. D. *et al.* Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L.F.S. Bacteriologia. IN: MOLINARO, E. *et al.* **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde**, Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. v.4, p. 221-239.

NUNEZ, C.V; FACHIN-ESPINAR, M. T; SOUZA, M. C.S. Isolamento de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo e  $\beta$ -sitosterol e avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante e tóxica sobre *Artemia salina* de *Casearia javitensis*. **Revista Fitos**, v.10, n.3, p. 220-372, 2016.

NEUFELD, P. M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnósticos**. 1.ed. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999.p.65-67.

OKOMO, U. *et al.* Etiologia da infecção bacteriana invasiva e resistência antimicrobiana em neonatos na África Subsaariana: uma revisão sistemática e meta-análise de acordo com as diretrizes de relatórios do STROBE-NI. **The Lancet Infectious Disease**, v.19, p.1219–1234, 2019.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 3, p. 857-863, 2006.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen." **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.8, p. 555-567, 2009.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995– 1001, 2014

PAIVA, C. P. *et al.* *Bacillus cereus* e suas toxinas em Alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 23, p. 170-171, março/abril. 2009.

PAZZA, A.C.V. *et al.* Composição nutricional e propriedades funcionais fisiológicas de cogumelos comestíveis. **Fag Journal Of Health** , v. 1, n. 3, p. 240-265, 2019.

PEL, H. J. *et al.* Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221-231, 2007.

PALLERONI, N. J. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: CORNELIS, P. (ed.) **Pseudomonas: genomics and molecular biology**. Bruxelas: Caister Academic Press, 2008.p.1-18.

RAMOS, H. P.; SAID, S. Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 443-449, 2011.

RIFAI, R.W. A revision of the genus **Trichoderma**. C.M.I. **Mycological Papers**, v.116, p.1-56, 1969.

O’GORMAN, C.M. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. **Fungal Biology Reviews**, v.25n.3, p.151- 157, out. 2011.

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, A. G. *et al.* Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

PENDLETON, J.N.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n.3, p. 297–308, mar. 2013.

PAPHITOU, N.I. Antimicrobial resistance: Action to combat the rising microbial challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v42, p. 25-28, 2013.

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

PIRES, I. M. O. *et al.* . M. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da caatinga, uma floresta tropical seca no nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 9, p. 155-161, 2015.

PODSCHUN, R; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. como patógenos nosocomiais: epidemiologia, taxonomia, métodos de tipagem e fatores de patogenicidade. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.589-603, 1998.

PURRELLO, S.M. *et al.* Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.2, n.2, p. 61-69, 2012.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v.30, p. 1446-1455, 2007.

RATTI, R. P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.

REINO, J.L. *et al.* Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 89–123, 2008

RIBEIRO, S.F.L. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de extratos brutos de fungos endofíticos isolados da espécie *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Para Recursos Amazônicos) - Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2015.

ROSA, D.R.; HERRERA, C.J.L. Evaluation of *Trichoderma* sp. as biocontrol agents against avocado root rot. **Biological Control**, v. 51, p. 66-71, 2009.

RUSSO, T.A; MARR, C.M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Microbiology Review**, v. 32, p.01 – 019, 2019.

SAAD, A.M. Determination of secondary metabolites products by *Trichoderma horzianum* and evaluate antimicrobial activity. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological And Chemical Sciences Determination**, p. 105-122, 2016.

SADYKOVA, V. S. *et al.* Antimicrobial activity of fungi strains of *Trichoderma* from middle siberia. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 355-361, 2015.

SHAW, L. *et al.* The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v.150, n.1, p. 217-228, 2004.

SHENTU, X. *et al.* The elicitation effect of pathogenic fungi on trichodermin production by *Trichoderma brevicompactum*. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

SILVA, J. C. *et al.* . Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 48-54, 2010.

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, 2011.

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

SANTURIO, J.M. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 3, n. 37, p. 803-808, 2007.

SANTOS, A.L.S. *et al.* Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, n.2, p. 209-220, 2006.

SNELDERS, E. *et al.* Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1.629-1.637, 2008.

SOUSA, C.S.C. ***Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation onto biomaterials**. 2009. 257f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) -Universidade do Minho, Braga, 2009.

SOUZA, C. A. **Aspergilose e candidíase pulmonar em pacientes imunocomprometidos: estudo comparativo dos achados de tomografia computadorizada de alta resolução.** 2006. 110f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, S. C. **Crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina a em meio de cultura sintético e a base de produtos agrícolas.** 2014.83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras,2014.

SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v.16, n. 4, p. 345-51, 2014.

SRIVASTAVA, M. *et al.* *Trichoderma* genome to genomics: a review. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 1-4, 2014

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

STEVENS, D.A. Aspergilose In: GOLDMAM L. *et al.* **Cecil tratado de medicina interna.** 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

STROBEL, G. A. *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SCHUSTER, E. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435. 2002.

TAKAHASHI, J.A; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n.7, p. 1807-1813, 2008.

TELLES, M.A.S.; MOSCA,A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação da concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 59, p. 15-19, 2000.

TEIXEIRA, M. F. S. *et al.* **Fungos da Amazônia:** Uma riqueza inexplorada. Manaus: Edua, 2011. p.246-247.

TESS, B. H. *et al.* Incidence of hospital-acquired infection and length of hospital stay. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 81–86, fev. 1993.

TIJERINO, A. *et al.* Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. **Fungal genetics and Biology**, v. 48, n. 3, p. 285-296, 2011

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed. 2012. p.934.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. Atheneu, 2004.

VALLET, I. **Formation de biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa*: mise en évidence de nouveaux gènes impliqués dans le processus d'adhérence**. Tese (Doutorado)- Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2003.

VITERBO, A.; HORWITZ, B.A. Mycoparasitism. In: BORKOVICH, K.A.; EBBOLE, D.J. (ed.). **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**, Washington: ASM Press, 2010. v.42, p. 676–693.

VIZCAÍNO, J.A. *et al.* Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. **Mycological Research**, v. 109, p. 1397–1406, 2005.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection** v.4, n.4, p. 481-489, abr. 2002.

WAGNER, H. E; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**: um atlas de cromatografia de camada fina. 2.ed. Berlim: Springer-Verlag,1996.

WEINDL, G.; WAGENER J.; SCHALLER M. Epithelial cells and innate antifungal defense. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 7, p. 666-675, 2010.

WYRES, K.L; HOLT, K.E. *Klebsiella pneumoniae* como um traficante-chave de genes de resistência a drogas de bactérias ambientais a clinicamente importantes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p.131–139, 2018.

WYRES, K.L.; LAM, M.M.C; HOLT, K.E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v.18, p. 344-349, 2020.

WOO, S. L. *et al.* *Trichoderma* - based Products and their Widespread Use in Agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8 p. 71-126, 2014.

ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.19, p.22-24, 2002.

ZAIDI, A.K.M. *et al.* Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. **Lancet**, v.365, n.9465, p. 1175–1188, mar./abr.2005.

ZIEBUHR, H.S. *et al.* Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.28, n.1, p.14–S20, aug. 2006.

ZUNITA, Z.; BASHIR, A.; HAFIZAL, A. Occurrence of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* in horses in Malaysia. **Veterinary World**, v.1, n.6, p. 165-167, 2008.

