

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

ISOLAMENTO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA
DE FUNGOS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE SOLO E MATÉRIA ORGÂNICA NA ILHA
DA TRINDADE

Ruither Arthur Loch Gomes

Orientador: Antônio Helvécio Tótola

Ouro Branco

Junho/2016

ISOLAMENTO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA
DE FUNGOS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE SOLO E MATÉRIA ORGÂNICA NA ILHA
DA TRINDADE

Ruither Arthur Loch Gomes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del Rei.

Orientador: Antônio Helvécio Tótola

Ouro Branco

Junho/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

ISOLAMENTO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA
DE FUNGOS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE SOLO E MATÉRIA ORGÂNICA NA ILHA
DA TRINDADE

Ruither Arthur Loch Gomes

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Antônio Helvécio Tótola – Orientador

Edson Romano Nucci – examinador

Ênio Nazaré de Oliveira Jr. – examinador

Ouro Branco, ____/____/____

Agradecimentos

A minha família, e principalmente minha mãe, que sempre me apoiou em tudo e incentivou a seguir meus sonhos.

A minha namorada, que me faz tão feliz e me ajuda a manter os pés no chão, seguindo sempre em frente.

Ao meu orientador, por servir de inspiração para me incentivar a prosseguir nesse difícil, mas gratificante, caminho pela graduação e entrada na carreira acadêmica, que sempre teve paciência com meus erros e minhas inseguranças.

As duas grandes amigas e colegas de laboratório que me ajudaram diversas vezes durante o andar do projeto.

Aos meus colegas do LABICEM, sempre mantendo o ânimo e o companheirismo no laboratório.

Aos meus professores, por sempre estarem dispostos a me auxiliarem por todo meu aprendizado.

Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.

Carl Sagan

RESUMO

Atualmente os microorganismos ganharam espaço em diversas linhas de pesquisa, visto que sua imensa diversidade genética faz com que tenham enorme potencial como fonte de recursos biológicos de interesse comercial. Os fungos são microorganismos cosmopolitas estritamente quimio-heterotróficos que estão entre as mais promissoras fontes de moléculas e enzimas com potencial industrial, podendo ser utilizados em diversos setores de produção. No trabalho apresentado foram feitos isolamentos de fungos a partir de amostras coletadas na ilha da Trindade, no litoral brasileiro e análise dos mesmos para determinadas atividades. Os fungos foram inicialmente crescidos em meio sólido e então isolados em novas placas Petri, de modo que algumas colônias foram purificadas e outras não. As colônias puras foram então inoculadas em meio líquido e tiveram seus produtos intracelulares e extracelulares separados em dois extratos, S1 e S2, sendo extrato extracelular e extrato intracelular, respectivamente. Esses extratos foram então analisados para determinar a ocorrência de produção de compostos antimicrobianos pelo método da difusão em meio sólido. Também foi realizada a análise da atividade citotóxica dos extratos obtidos através do método de Mossman, usando o sal de tetrazólio brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (conhecido como MTT). Nessa análise da atividade citotóxica foi possível identificar alguns fungos com essa atividade, entre eles se destaca os extratos obtidos de fungos coletado no platô da Crista de galo. Alguns fungos ainda serão mais estudados em trabalhos futuros.

Palavras chave: Bioprospecção; Fungos Filamentosos; Isolamento; Atividade Antibiótica; Atividade Citotóxica.

Lista de Figuras

Figura 1 - Figura ilustrativa, pesquisas científicas são realizadas utilizando compostos provenientes da natureza obtendo novos conhecimentos e identificando novos compostos com usos promissores.....	1
Figura 2 - Biodiversidade brasileira observada nas mais diferentes formas de vida encontradas na natureza, uma fonte extremamente promissora de recursos genéticos.....	3
Figura 3 - Imagem ilustrativa de um fungo Orelha-de-pau (<i>Pycnoporus sanguineus</i>), pertencente à família <i>Polycaraceae</i>	5
Figura 4 - Fungos filamentosos visualizados no microscópio; A) representa os fungos do gênero <i>Penicillium</i> ; B) representa os fungos do gênero <i>Aspergillus</i> ; e C) representa os fungos do gênero <i>Fusarium</i>	7
Figura 5 - Imagem ilustrativa dos produtos alimentícios Tempeh e Tofu, obtidos pela fermentação de soja utilizando fungos.....	8
Figura 6 – O surgimento do câncer, onde células mutadas se dividem de forma desordenada e excessiva, chegando a invadir outros tecidos e órgãos.....	9
Figura 7 - Alexander Fleming foi médico, farmacologista, biólogo e botânico, nasceu em 1881 em Lochfield e na década de vinte descobriu a proteína antimicrobiana lisozima e o primeiro antibiótico, a penicilina.....	11
Figura 8 – Imagem ilustrativa de uma placa para teste de atividade antibiótica pelo método da difusão em ágar, onde antibióticos diferentes em concentrações diferentes geram halos de inibição com diâmetros diferentes.....	13
Figura 9 – Imagem ilustrativa de uma cromatoplaça na realização do teste de atividade antibiótica por bioautografia, onde um extrato pré-separado por cromatografia é analisado para formação de halos de inibição.....	14
Figura 10 - Fungos isolados de samambaias, nomeados SM de 1 a 3 e FSM, os fungos isolados foram identificados como: A) FSM-C; B) SM1- A; C) SM1-C1; D) SM1-C2; E) SM1-D; F) SM2-A; G) SM3-A; e H) SM3-B.....	19

Figura 11 - Fungos isolados de um Cnio, nomeados CA, os fungos isolados foram identificados como: A) CA-A; B) CA-B; C) CA-C; D) CA-D; E) CA-E.....	19
Figura 12 - Fungos isolados do platô Crista de Galo, nomeados CG, os fungos isolados foram identificados como: A) CG-A; B) CG-B; C) CG-C; D) CG-E.....	20
Figura 13 - Fungos isolados do platô do desejado, nomeados PD de 1 a 5 e SN, os fungos foram identificados como: A) SN-B; B) PD1-A; C) PD2-A; D) PD2-B; E) PD2-C; F) PD4-A; G) PD5-D.....	20
Figura 14 - Fungos isolados de fezes de caranguejo, nomeados FDC, os fungos foram identificados como: A) FDC-A; e B) FDC-B.....	21
Figura 15 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 1 em bactérias Gram positivas.....	22
Figura 16 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 1 em bactérias Gram negativas.....	23
Figura 17 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 2 em bactérias Gram positivas.....	23
Figura 18 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 2 em bactérias Gram negativas.....	23
Figura 19 - Gráfico de barras da média das absorvâncias, contendo o desvio padrão, em comparao com controle negativo, onde valores inferiores ao controle correspondem a maior atividade citotóxica.....	26

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Nomes dados aos fungos obtidos, definindo as iniciais de acordo com qual fonte foi utilizada, e em seguida as letras do alfabeto em ordem crescente são usadas para separar as diferentes colônias obtidas de uma mesma fonte, sendo seguido a essa letra um número em casos de mais fungos purificados de um isolado.....	18
Tabela 2 - Ordem das amostras inoculadas e antibióticos usados na análise da presença de atividade antibiótica, sendo definida como 6 fungos e os dois antibióticos na primeira placa do par, e 5 fungos e os dois antibióticos na segunda placa do par.....	22
Tabela 3 – Amostras analisadas em cada coluna da microplaca para realização do teste de atividade citotóxica.....	25
Tabela 4 - Absorbância inicial das amostras em quadruplicatas, de 1 a 11 as amostras de fungos avaliadas e na última coluna a absorbância dos poços onde não foi realizada a adição de extratos. Ainda as quatro primeiras linhas representam os extratos extracelulares e as quatro últimas linhas representam os extratos intracelulares dos fungos.....	25
Tabela 5 - ANOVA para extrato relativo ao meio extracelular (S1), usando α igual a 0,05, permitindo identificar se existe ou não diferença de quantidade de células viáveis presentes nos poços da microplaca.....	27
Tabela 6 - ANOVA para extrato relativo ao meio intracelular (S2), usando α igual a 0,05, permitindo identificar se existe ou não diferença de quantidade de células viáveis presentes nos poços da microplaca.....	27
Tabela 7 – Tabela contendo os valores de t e o valor-P para cada um dos extratos de cada fungo, onde o valor-P é comparado com o alfa de 0,05 e t é comparado com o valor tabelado de t crítico, que é de 4,302653	28

Sumario

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão Bibliografica.....	3
3.1 Bioprospecção.....	3
3.2 Fungos.....	5
3.3 Aplicações de fungos.....	7
3.3.1. – Aplicações gerais de fungos.....	7
3.3.2. – Ação citotóxica.....	9
3.3.3. – Ação antibiótica.....	10
4. Metodologia.....	14
4.1 Obtenção dos fungos.....	14
4.2 Isolamento das amostras.....	14
4.3 Manutenção das culturas.....	15
4.4 Obtenção dos extratos intracelular e extracelular.....	15
4.5 Análise antibiótica.....	16
4.6 Cultivo Celular.....	16
4.7 Análise Citotóxica.....	17
5. Resultados e discussão.....	17
5.1 Isolamento das culturas.....	17
5.2 Análise antibiótica.....	21
5.3 Análise Citotóxica.....	24
6. Conclusão.....	29
 Referências.....	 30

1. INTRODUÇÃO

A sobrevivência da sociedade humana sempre foi diretamente dependente dos recursos naturais, tanto bióticos (como plantas e animais) quanto abióticos (como ar e água), entretanto o modo como os recursos são utilizados mudou com o tempo. Antigamente a humanidade recorria à caça e coleta, entretanto com seu desenvolvimento ao passar dos anos, a humanidade começou a domesticar animais e realizar plantações, aplicando nessas ações o princípio da seleção das espécies mais interessantes, ou seja, as que produziam mais recursos ou resistiam mais às adversidades (AZEVEDO, 2003), de modo que até hoje, ao buscarmos desenvolver novas tecnologias e produtos, ainda recorremos frequentemente a esses recursos naturais.

Durante algum tempo a indústria química, através da química combinatória e dos ensaios em larga escala, foi amplamente focada para desenvolvimento de pesquisas, entretanto esta não conseguiu se consolidar completamente como desenvolvedora de compostos fármacos por não ter atingido os objetivos e o impacto esperado, visto que possui limitações de variedades possíveis de serem sintetizadas. Já a natureza é tida como uma fonte praticamente imensurável de novos fármacos e compostos bioativos. Esses recursos naturais se destacam por possuírem, além de atividade biológica, uma enorme diversidade química e complexidade estrutural. Assim observa-se cada vez mais a atenção dos pesquisadores sendo voltada para fontes de diversidade microbiana pouco exploradas, como regiões marinhas, locais isolados ou relativamente inhóspitos (NASCIMENTO et al., 2014).



Figura 1 - Figura ilustrativa, pesquisas científicas são realizadas utilizando compostos provenientes da natureza obtendo novos conhecimentos e identificando novos compostos com usos promissores.

Fonte: <http://cibfar.ifsc.usp.br/2016/03/13/biodiversidade-bioprospeccao-e-inovacao-no-brasil/>

Hoje em dia, com o aprimoramento e criação de técnicas das áreas da genômica, da biologia molecular, da metagenômica e da bioinformática, vem sendo modificado esse processo de prospecção de novas espécies com características desejáveis, como por exemplo os microorganismos de difícil obtenção e manutenção que previamente eram trabalhosos de se estudar, mas que atualmente se avança cada vez mais no manejo dos mesmos. Desse modo

tornou-se possível uma exploração mais abrangente dos recursos naturais, permitindo ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade, visto que se estima que foram identificados apenas 10% dos microorganismos existentes no planeta (PEIXOTO, 2008; OLIVEIRA, 2006).

Ainda, dos inúmeros microorganismos não patogênicos utilizados no setor industrial, os fungos filamentosos ganham destaque especial pela facilidade de cultivo e a alta eficiência desses na produção de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006). Em geral existe uma grande variedade de fungos produtores de metabólitos de interesse farmacológico. No caso dos antibióticos, por exemplo, já foram estudados fungos de diversos gêneros que expressam atividade antimicrobiana, e entre os produtores desses compostos, os mais promissores são os fungos endófitos, os fitopatogênicos, os entomopatogênicos, os rizosféricos e os leveduriformes (TAKAHASHI et al., 2008).

Mesmo assim, os fungos que são considerados de fácil cultivo, que são mais abundantes na natureza e que produzem esporos em grande quantidade, continuam sendo frequentemente estudados. São conhecidas, por exemplo, muitas espécies de fungos do gênero *Penicillium* que produzem metabólitos secundários promissores, como o ácido micofenólico, que é ativo contra bactérias gram-positivas. Espécies do gênero *Aspergillus* também vem sendo alvo de muito estudo, como o *A. fumigatus* que após ser cultivado em reator de larga escala, produziu sete dictopirazines, que são compostos que apresentaram capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* e *M. luteus*. Desse modo, os fungos têm atraído atenção das indústrias farmacêuticas por esse potencial de seus metabólitos (TAKAHASHI et al., 2008).

Outra utilização em potencial para os metabólitos fúngicos é no tratamento do câncer. Normalmente existem três abordagens médicas principais utilizadas para tratar essa doença: a irradiação, a excisão cirúrgica e a quimioterapia. Nessa última abordagem há a utilização de poderosos compostos citotóxicos que possuem ação em fases específicas do ciclo celular, sendo que os normalmente utilizados agem durante a divisão celular. Assim se torna de grande importância a prospecção de novos compostos citotóxicos e também o correto entendimento dos ciclos celulares, permitindo o desenvolvimento eficaz de novas drogas antineoplásicas (MORAES et al., 2007).

2. OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo isolar amostras de fungos coletados na ilha da Trindade no litoral brasileiro e avaliar a presença de compostos antimicrobianos e com atividade citotóxica a partir dos extratos obtidos dos meios extracelulares e intracelulares dos fungos isolados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bioprospecção

Nas últimas décadas a preservação ambiental se tornou um tópico de grande importância na comunidade internacional, levando ao surgimento de termos como biotecnologia, recursos genéticos, bioprospecção, entre outros. Assim, juntamente com o avanço de tecnologias, como da biologia molecular, o material genético se tornou um recurso muito explorado, e o conhecimento sobre os recursos genéticos adquiriu valor de mercado. Desse modo o Brasil, possuindo uma biodiversidade que se estima que contemple aproximadamente 20% das espécies existentes, se destaca como uma fonte promissora de recursos genéticos (AZEVEDO, 2003).



Figura 2 - Biodiversidade brasileira observada nas mais diferentes formas de vida encontradas na natureza, uma fonte extremamente promissora de recursos genéticos.

Fonte: <https://blogideiassustentaveis.wordpress.com/tag/flora-e-fauna-brasileiras/>

Como exemplo, ao analisar a fauna brasileira, observa-se que já foram descritas mais de 517 espécies de anfíbios (sendo 294 endêmicas), 524 espécies de mamíferos (onde 131 são endêmicas), 1622 espécies de aves (com 191 endêmicas) e 468 répteis (sendo 172 endêmicas). Além disso existem estimativas de que o Brasil possua mais de 3 mil espécies de peixes de água doce e possua entre 10 a 15 milhões de espécies de insetos. Das plantas superiores, as

estimativas sugerem que exista entre 55 mil e 60 mil espécies, o que representa de 22 a 24% do número total das espécies do mundo. Desse modo, também se estima que aproximadamente 45% do PIB brasileiro é oriundo da utilização de componentes da biodiversidade, provenientes tanto do Brasil quanto de outros países (AZEVEDO, 2003).

A constante utilização desses recursos naturais acarretou na necessidade de criar mecanismos e leis para proteger o meio ambiente em benefício das gerações presentes e futuras. Assim se estabeleceram normas para legislar a busca por novos compostos e organismos com potencial de uso comercial, firmando o patrimônio genético disponível na natureza como um bem imaterial. A bioprospecção ficou assim caracterizada como “atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial” (PALMA et al, 2012).

Assim foram firmados três princípios básicos sobre a preservação da diversidade biológica. Segundo AZEVEDO (2003), esses são:

- “Considerar o valor intrínseco da biodiversidade, ou seja, além de encarar a biodiversidade como recurso explorável, valorizar suas propriedades fundamentais, como a manutenção do equilíbrio ecológico e a diversidade genética, além dos aspectos sociais, científicos, educacionais, recepcionais e estéticos”.
- “Reafirmar o direito soberano dos estados (países) sobre seus próprios recursos biológicos e genéticos. A implicação direta deste princípio é que estes recursos não são mais tratados como “patrimônio da humanidade”, devendo os países regulamentar o seu acesso e a sua exploração”.
- “Reafirmar a responsabilidade do estado (países) pela conservação de sua biodiversidade e pela utilização sustentável de seus recursos biológicos”.

Entre todos os seres vivos que compõem essa imensa diversidade biológica, os microorganismos se destacam por serem os que habitam os mais variados ambientes. Esses seres podem consumir as mais diversas fontes de energia e viver nas mais diferentes condições ambientais, o que indica que eles podem tirar proveito de qualquer nicho em que estejam e assim se estima que possuam a maior diversidade genética global (TORTORA et al., 2002).

Desse modo, essa elevada diversidade e adaptabilidade genética dos microorganismos levou ao estudo desses como uma fonte muito promissora de compostos com atividade biológica para serem aplicados em bioprocessos. Assim o conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de microorganismos adquiriu grande foco da comunidade internacional, cada dia crescendo mais a utilização destes organismos nos mais diferentes setores, tanto ambientais como industriais (OLIVEIRA, 2006).

3.2 Fungos

Normalmente os fungos são lembrados somente pelos danos que causam, seja promovendo a deterioração de equipamentos valiosos, obras de arte e combustíveis ou por causar doenças como micoses, alergias e parasitando plantas de modo prejudicial. Entretanto os benefícios que eles geram também possuem grande impacto no cotidiano da maioria das pessoas, sendo utilizados na produção de diversos itens comuns na sociedade. Desde a preparação de alimentos em geral, como massas ou bebidas até a utilização em tratamentos ambientais, em pesticidas e em outras grandes produções industriais, como no setor de combustíveis ou no setor farmacêutico (SILVA et al., 2006), os fungos detêm grande importância e aplicação no desenvolvimento de tecnologias que auxiliem o homem.

Fungos são microorganismos eucariotos com papel indispensável na natureza, pois através de enzimas extracelulares, como as celulasas, eles decompõem matéria orgânica morta, reciclando assim nutrientes vitais que não podem ser digeridos pela maioria dos animais. Estes são organismos estritamente quimio-heterotróficos, sendo em sua maioria aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, com poucos fungos conhecidos apresentando anaerobiose estrita (TORTORA et al., 2002). Estimasse atualmente que existam mais de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo que aproximadamente 69 mil dessas espécies são conhecidas pelos micologistas (SILVA et al., 2006).



Figura 3 - Imagem ilustrativa de um fungo Orelha-de-pau (*Pycnoporus sanguineus*), pertencente à família Polycaraceae.

Fonte: <http://adolfobutzkeblog.blogspot.com.br/2015/12/pycnoporus-sanguineus-orelha-de-pau.html>

Alguns fatores ambientais, como pH, teor de umidade e temperatura, possuem grande influência no crescimento dos fungos. No caso da temperatura, por exemplo, existem algumas espécies que suportam altas temperaturas (termófilas) ou baixas temperaturas (psicrófilas),

entretanto a maioria dos fungos conhecidos é mesófilo, crescendo somente em temperaturas de 15 a 40°C (ESPOSITO et al., 2010).

De acordo com SILVA et al. (2006), “as células dos fungos não possuem plastídios e nem centríolo. As mitocôndrias são constituídas por cristas planas. Também estão presentes a estrutura de Golgi e os peroxissomos. Possuem parede celular constituída principalmente por quitina e β -glucanos. A membrana celular é constituída por ergosterol, um esteroide característico de fungos, também presente em algumas microalgas. Flagelos podem estar presentes somente nas estruturas de reprodução em alguns grupos”.

Apresentando essa elevada quantidade de espécies, os fungos são considerados seres cosmopolitas, visto que são encontrados em praticamente todos os habitats, como nos solos, em plantas, no ar, na água e até em animais. Esses organismos podem ser encontrados em formas microscópicas, como no caso de leveduras, ou em formas macroscópicas, como nos casos de muitos fungos filamentosos (CARDOSO, 2011).

Os fungos filamentosos possuem estruturas de frutificação que crescem dando origem a tubos germinativos, e esses formam as hifas ou filamentos. Essas hifas podem ser septadas, onde o septo promove uma individualização incompleta das células fúngicas que compõem as hifas (em que existem poros ligando os citoplasmas), dividindo-as em segmentos, ou serem hifas cenocíticas, onde não há septos dividindo a estrutura (TORTORA et al., 2002).

Essas hifas possuem, como principal papel, a obtenção de nutrientes para o crescimento da colônia, enquanto que os esporos possuem função reprodutiva, sendo que o estudo dos esporos sexuais e assexuais produzidos pelos fungos filamentosos possuem importante relevância na identificação dos mesmos (TORTORA et al., 2002). Eles ainda exibem o fenômeno da parassexualidade, onde ocorre recombinação genética por crossing-over durante a fase de mitose, levando a troca de genes entre cromossomos (SILVA et al., 2006).

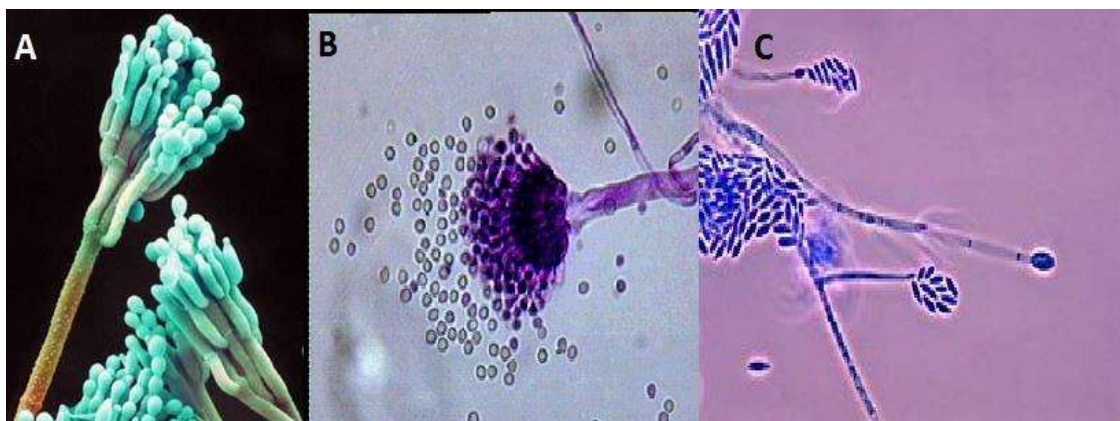


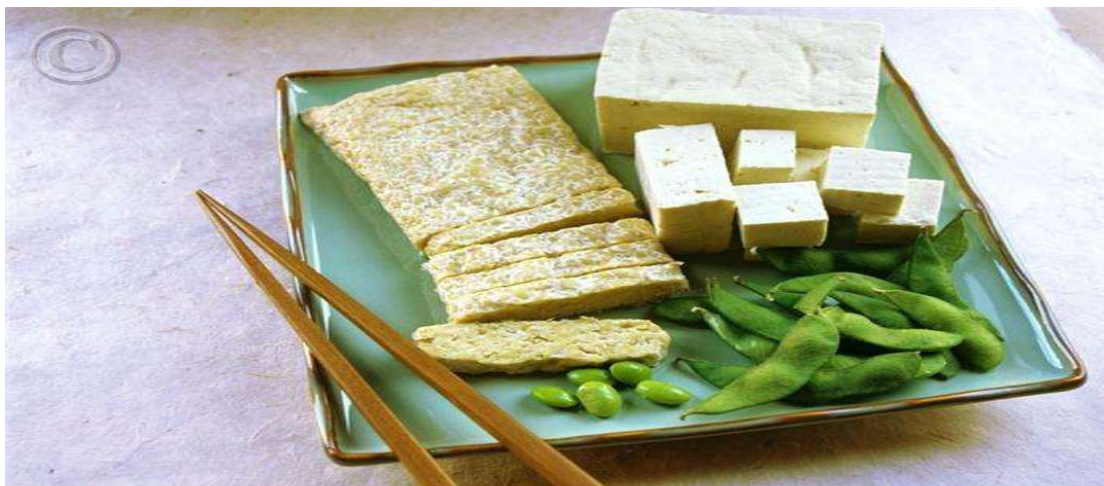
Figura 4 - Fungos filamentosos visualizados no microscópio; A) representa os fungos do gênero *Penicillium*; B) representa os fungos do gênero *Aspergillus*; e C) representa os fungos do gênero *Fusarium*.
Fonte: Montagem própria utilizando imagens encontradas na internet.

Até algumas décadas atrás, o pouco conhecimento disponível sobre o Reino *Fungi* fazia com que o mesmo fosse colocado próximo às plantas. Entretanto atualmente a hipótese considerada mais plausível é de que esses seres estão bem mais próximos do Reino *Animalia* do que do *Plantae*, por possuir características como presença de quitina, flagelo posterior (cílio), armazenamento em forma de glicogênio e seu código mitocondrial UGA codificar triptofano. Como dito, as estruturas reprodutivas dos fungos, os esporos, são utilizados na identificação dos mesmos, desse modo a produção de zigotos, zoósporos, ascósporos e basidiósporos é utilizada para colocar as espécies de fungos nas Divisões (Filos) *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Já os fungos que não produzem essas estruturas são colocados em categorias artificiais, como por exemplo na Divisão-forma *Deuteromycota*, que são os fungos antigamente chamados de *Fungi Imperfectii* (ESPOSITO et al., 2010).

3.3 Aplicações de fungos

3.3.1. Aplicações gerais de fungos

Desde a antiguidade a humanidade utiliza fungos na produção de alimentos, como, por exemplo, na produção de bebidas por povos indígenas no continente americano, ou nos alimentos à base de leite pelos europeus, ou até na produção de alimentos por povos orientais que a séculos utilizam a fermentação como forma de enriquecer alimentos (ESPOSITO et al., 2010), como o Tempeh, que é um fermentado de soja nutritivo preparado a partir de uma associação composta principalmente de fungos, como o *Rhizopus ligosporus* e o *R. oryzae*; o Tofu, que é um tipo de queijo feito pela fermentação da soja utilizando *Actinomucor elegans* ou outras espécies do gênero *Mucor* e de *Rhizopus*; e o Oncom, que é uma pasta de amendoim fermentada utilizando o *Rhizopus oligosporus* (SILVA et al., 2006).



42-17261152 [RF] © www.visualphotos.com

Figura 5 - Imagem ilustrativa dos produtos alimentícios Tempeh e Tofu, obtidos pela fermentação de soja utilizando fungos.

Fonte: Site <http://balanceduniversity.com/news/7-protein-sources-that-arent-meat>.

Esses microorganismos também podem ser utilizados no tratamento de resíduos agrícolas através da biodegradação de materiais lignocelulósicos, que é considerado um dos mais importantes ciclos do carbono encontrados na natureza, visto que os fungos, principalmente da podridão branca, são os organismos mais eficazes na decomposição desse material (ESPOSITO et al., 2010). Esses resíduos agroindustriais são abundantes e possuem baixo custo, se tornando uma fonte promissora de biocombustíveis. Entretanto a dificuldade na hidrólise destes, em consequência de sua complexidade físico-química, surge como um fator limitante para esse mercado, o que estimula a busca constante por novas espécies de fungos com maior poder de degradação desses compostos lignocelulósicos.

Outra área em que se encontra aplicação de fungos é na biorremediação de regiões poluídas visando reestabelecer o equilíbrio ecológico. Como dito, os fungos são organismos decompositores com um importante papel no equilíbrio ambiental, já que excretam enzimas extracelulares que os permitem utilizar uma vasta gama de substratos de diversas massas molares. Assim esses microorganismos podem converter compostos tóxicos em biomassa e produtos de catabolismo através da mineralização, ou até gastar energia própria para oxidar compostos tóxicos através da cometabolização, de modo a se proteger contra essa toxicidade. Apesar dessa notoriedade em degradar diversos compostos estimulando a reciclagem de nutrientes, os fungos ainda possuem utilização limitada na biorremediação em comparação com bactérias (ESPOSITO et al., 2010), o que também reforça a necessidade de se descobrir novas espécies para suprir essa demanda.

Fungos também são estudados pela indústria de corantes naturais como uma fonte de extraordinária diversidade de pigmentos. Normalmente buscasse pigmentos que não afetem ou

causem riscos à saúde para serem usados como corantes alimentícios, entretanto alguns pigmentos estudados possuem características bioativas, tanto benéficas (por exemplo, com propriedades antioxidantes ou inibindo a mutagênese) quanto maléficas (por exemplo, no caso de micotoxinas pigmentadas, causando patogênese) (ESPOSITO et al., 2010), possuindo assim potencial para aplicações diversas.

Na indústria farmacêutica também ocorre a aplicação de compostos produzidos por fungos, como na produção de β -caroteno e outras vitaminas de elevada importância, ou na utilização de polissacarídeos para tratamento de doenças, como o câncer (SILVA et al., 2006).

3.3.2. Ação citotóxica

O câncer é uma doença causada pela exposição de células normais a agentes químicos e físicos que causem mutações, levando a um desequilíbrio nos mecanismos responsáveis pelo balanço entre morte e renovação celular. Nele o genoma de uma célula é modificado afetando os genes que são responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular, como por exemplo os genes supressores de tumores, de modo que passa a ocorrer um aumento na proliferação da célula, displasia e indução de angiogênese. Assim ocorre a formação de um aglomerado solido de células (o tumor) e em alguns casos essas células podem se propagar pelo resto do organismo, causando metástase (DAVID, 2013).

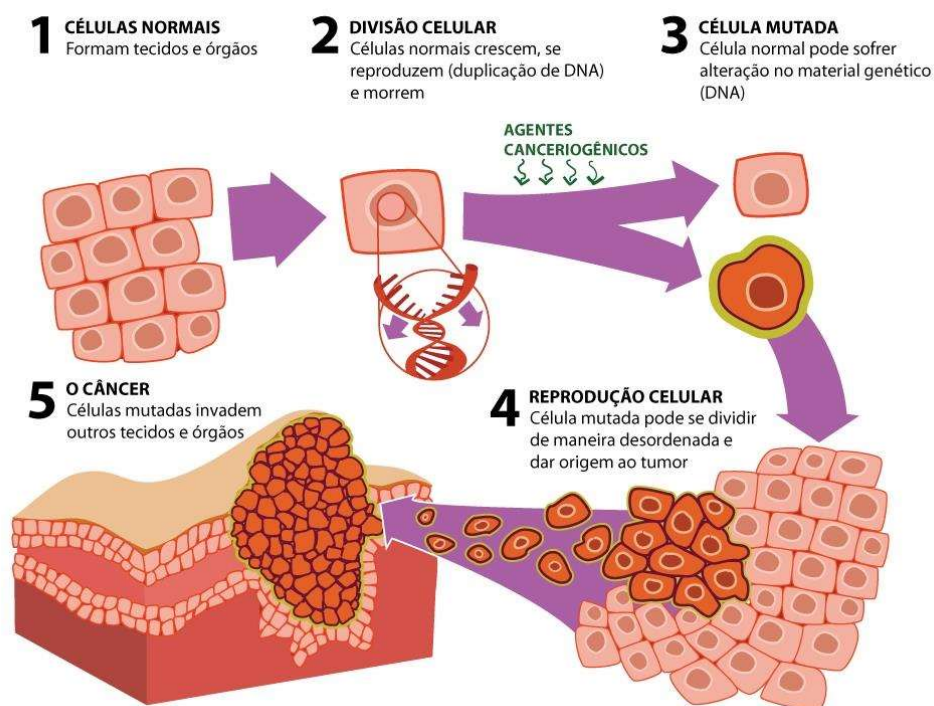


Figura 6 – O surgimento do câncer, onde células mutadas se dividem de forma desordenada e excessiva, chegando a invadir outros tecidos e órgãos.

Fonte: <https://cs6acupuntura.wordpress.com/tag/cancer/>

Após décadas de pesquisa, foram identificados mais de 100 tipos e subtipos diferentes de câncer, o que dificulta encontrar tratamentos para todos. Dentre os métodos existentes empregados nesse tratamento, temos a quimioterapia, que se baseia em tentar destruir células neoplásicas enquanto preserva-se as células normais. Isso é feito por diferentes modos, como por exemplo reduzindo os nutrientes absorvidos pelas células tumorais, marcando-as para serem reconhecidas e destruídas pelo sistema imune ou até bloqueando os sinais de crescimento dessas células (DAVID, 2013). Desse modo, os compostos citotóxicos, caso tenham ação em etapas específicas do ciclo celular, tornam-se grandes aliados no combate dessa doença.

Os fármacos normalmente utilizados para esses tratamentos se dividem em dois grupos: os fármacos ciclo específicos, como a vincristina e a vimblastina, atuando como antimitóticos e antimetabólitos (5-fluorouracila e metotrexato), e taxanos isolados de espécies do gênero *Taxus* (Taxaceae); e os fármacos ciclo não-específicos, que normalmente são antibióticos antitumorais como a doxorrubicina, análogos de platina, antraciclinas e campotecinas. Entretanto já foram documentados casos de resistência a alguns desses compostos, reforçando a necessidade de encontrar novos medicamentos para o tratamento do câncer, como os compostos citotóxicos (DAVID, 2013).

Para a avaliação da atividade citotóxica de determinados compostos, um dos métodos mais empregados por sua praticidade e rapidez é o método descrito por MOSMANN (1983), sendo esse realizado aplicando o sal de tretrazólio brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (conhecido como MTT) na cultura celular, em que este sal sofre redução por desidrogenases mitocondriais de células ativas, formando um cristal azul escuro que se acumula dentro das células. Após isso é adicionado Dimetilsufóxido (DMSO) para dissolver os cristais e é feita a análise da absorbância em um espectrofotômetro, onde quanto maior for a leitura, mais células viáveis estão presentes (DAVID, 2013).

3.3.3. Ação Antibiótica

Uma das áreas mais promissoras para o emprego de fungos na biotecnologia está na produção de compostos antibióticos, ou seja, compostos que consigam inibir ou até matar outros microorganismos. O termo foi encunhado inicialmente por Paul Vuillemin, em 1889, mas mais atualmente teve sua definição alterada para uma forma mais inclusiva, onde são considerados também, além dos compostos produzidos por diversos microorganismos, os produzidos por plantas, ou até sinteticamente em laboratório, ao mimetizar compostos naturais já conhecidos (TAKAHASHI et al., 2008).

Existem relatos muito antigos da utilização indireta desses compostos, como, por exemplo, os chineses que usavam sapatos mofados para curar feridas infecciosas 3000 AC. O primeiro metabólico de origem fúngica com notória eficácia em matar microorganismos foi a penicilina, um antibiótico produzido por *Penicillium Chrysogenum*, que foi descoberto acidentalmente em 1928 por Fleming, e reduziu em 10 vezes a ocorrência de mortes em consequência de infecções na segunda guerra mundial em relação à primeira guerra. A partir desses resultados a penicilina passou a ser produzida industrialmente em larga escala, originando a indústria farmacêutica. Assim iniciou-se a busca por microorganismos gerando grande prospecção de biomoléculas ativas (TAKAHASHI et al., 2008).

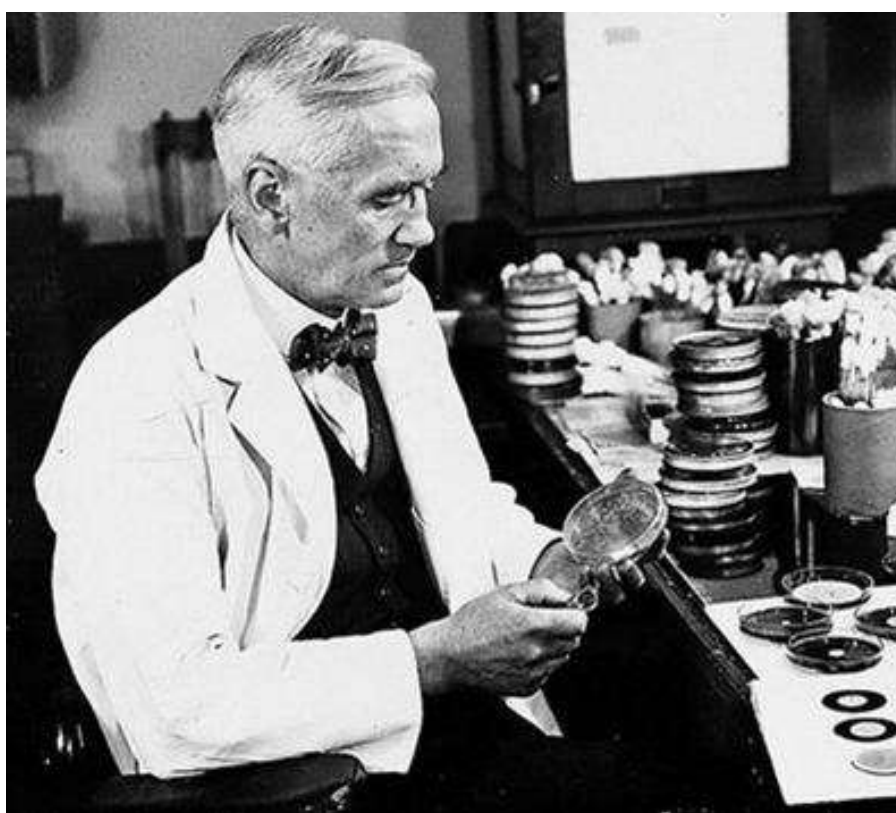


Figura 7 - Alexander Fleming foi médico, farmacologista, biólogo e botânico, nasceu em 1881 em Lochfield e na década de vinte descobriu a proteína antimicrobiana lisozima e o primeiro antibiótico, a penicilina.

Fonte: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/a-descoberta-penicilina.htm>.

Após décadas de descobertas de novos compostos antibióticos, nos anos 80 houve um brusco declínio na quantidade de pesquisas sobre o tema, que continuou descendo ainda mais na década de 90 após o surgimento das triagens robóticas de grande porte e a recente disponibilidade de grandes bancos de dados, pois passou-se a acreditar que a guerra contra as infecções estava ganha. Entretanto a evolução das doenças infecciosas e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos pelas bactérias patogênicas, em consequência do uso incorreto dos mesmos,

levaram a um recente aumento nas pesquisas farmacêuticas nessa área, reascendendo o setor (TAKAHASHI et al., 2008).

Além de algumas espécies de fungos conhecidamente produtoras de compostos antibióticos, como as espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, atualmente também se estuda algumas classes específicas de fungos com potencial de serem produtores desses compostos, como dito anteriormente. Os fungos endófitos, por exemplo, são microorganismos que colonizam o interior de vegetais sem causar doenças, e em contrapartida dos nutrientes que absorvem, eles produzem substâncias que podem ser utilizadas pelas plantas, como principalmente os antibióticos, e também fatores de crescimento, que auxiliam a saúde da planta hospedeira. Um outro exemplo é o fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus*, que foi obtido de larvas de insetos, e após crescimento e ensaios, foi possível isolar e identificar um composto derivado do ácido tetrâmico, denominado paecilosetina, com ação antimicrobiana contra *B. subtilis*, *Cladosporium resinae* e *Trichophyton mentagrophytes* (TAKAHASHI et al., 2008), reforçando ainda mais a importância do estudo dos fungos como produtores em potencial de compostos antibióticos.

Para a detecção da atividade antibiótica de compostos, existem diversos métodos propostos para serem utilizados. Entre os mais comumente aplicados temos o método da difusão em ágar (também conhecido como método da difusão em placas), o método da diluição em caldo e o método da bioautografia. De modo geral a difusão em ágar é mais simples de ser aplicada e reproduzida, mais econômica e permite teste de vários compostos em uma única placa.

O método da difusão em ágar é caracterizado como um método físico onde um microorganismo de crescimento rápido é colocado para crescer em meio de cultura sólido onde existe uma região contendo o composto que se deseja analisar para a presença de atividade antibiótica. A avaliação da atividade é feita pela comparação da medida do halo de inibição de crescimento exibido, em relação a um padrão (controle positivo), que é uma substância com potencial antibiótico conhecido. A região de aplicação da substância com potencial antibiótico é delimitada de diferentes formas, podendo ser com discos de papel filtro (previamente estéreis, aplicando a substância encima deles), pela perfuração do ágar (formando poços onde se aplica a substância) ou com cilindros de vidro ou de aço inoxidável (estéreis, onde se aplica a substância no interior do cilindro) (OSTROSKY et al., 2008).

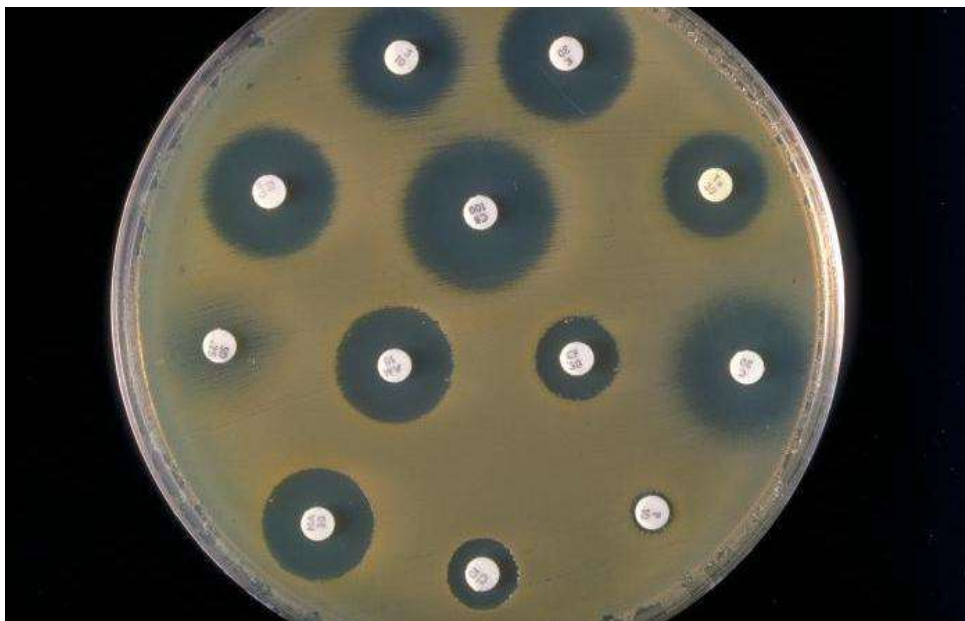


Figura 8 – Imagem ilustrativa de uma placa para teste de atividade antibiótica pelo método da difusão em ágar, onde antibióticos diferentes em concentrações diferentes geram halos de inibição com diâmetros diferentes.

Fonte: <http://www.fcencias.com/2014/01/23/testes-de-susceptibilidade-aos-antimicrobianos-laboratorio-online/>

No método da diluição em caldo é feita uma análise do crescimento de um microorganismo em meio líquido (contendo a substância que se deseja avaliar) em relação a um padrão positivo (onde o meio contém uma substância com potencial antibiótico conhecido) e em relação a um padrão negativo (contendo somente meio de cultura líquido e o líquido utilizado na dissolução da substância avaliada). A determinação do crescimento é feita utilizando espectrofotometria, e através dessa análise se obtém resultados quantitativos. Como desvantagem, esse método tem difícil detecção de contaminação em ensaios clínicos. Esse método pode ser feito utilizando macrodiluições, onde o teste é feito em tubos de ensaio contendo de 1 a 10 mL (que requer muito espaço e gera muito resíduo), ou em microdiluições, onde o teste é feito em microplacas de 96 poços (que ocupa menos espaço, mas possui erros associados às células aderindo na base dos poços ou compostos precipitando, obtendo assim leituras erradas de absorbância) (OSTROSKY et al., 2008).

A bioautografia é realizada baseando-se na separação de substâncias de misturas complexas por cromatografia em papel ou em camada delgada. Essa técnica permite localizar e identificar regiões da cromatoplaça onde ocorreu inibição do crescimento bacteriano. Uma desvantagem dessa técnica é que diversos fatores podem prejudicar os resultados, necessitando atenção a parâmetros como esterilização das cromatoplaças, a fase móvel e os aditivos utilizados, o microorganismo utilizado, o tempo de incubação, entre outros. Esse método normalmente é dividido em 3 tipos: o método bioautográfico de contato, onde a cromatoplaça é colocada na superfície do meio sólido em uma placa Petri e as substâncias difundem dela para o ágar; o

método bioautográfico de sobreposição do ágar, onde a cromatoplaça é colocada numa placa Petri e o meio sólido é colocado após, e depois do tempo de crescimento é usado o sal de tetrazólio para corar a bactéria e analisar os halos de inibição; e o método bioautográfico direto, onde a cultura bacteriana é colocada em meio líquido e borrifada encima da cromatoplaça para crescer, e então são avaliados os halos de inibição obtidos (SOUTO, 2014).

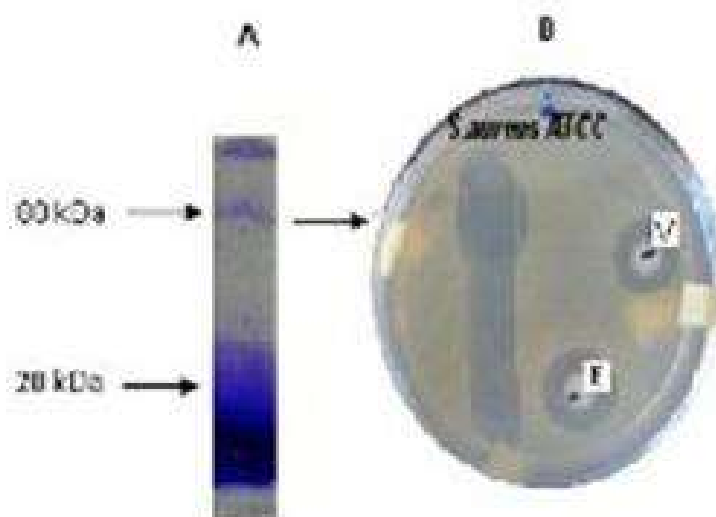


Figura 9 – Imagem ilustrativa de uma cromatoplaça na realização do teste de atividade antibiótica por bioautografia, onde um extrato pré-separado por cromatografia é analisado para formação de halos de inibição.
Fonte: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3768866_bjm-43-1206-g004&req=4

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos fungos

Os fungos utilizados no trabalho foram coletados de amostras sólidas na ilha de Trindade pelo orientador do trabalho, Doutor Antônio Helvécio Tótola, sendo essa ilha localizada no arquipélago de Trindade e Martin Vaz, a 1500 KM do litoral brasileiro. Essas amostras foram obtidas de diferentes fontes, que foram usadas para nomear os fungos purificados, como de samambaias (nomeados SM de 1 a 3 e FSM), de um cânion (nomeado CA), de um platô chamado crista de galo (nomeado CG), de um platô chamado desejado (nomeados PD de 1 a 5 e SN) e de fezes de caranguejo (nomeado FDC).

4.2 Isolamento das amostras

Pedaços das amostras obtidas foram transferidas para tubos de 15 mL. Foi adicionada solução salina (0,9% de NaCl) na proporção de 1:1 massa/volume em cada tubo. Os tubos foram cuidadosamente homogeneizados e foi então inoculado 100µL de cada um por placa Petri, utilizando como meio de cultivo 20 mL de ágar Sabouraud 4% por placa, e por último sendo

espalhados pela placa com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram levadas para uma estufa a 27°C por 5 dias.

Após o crescimento, foram selecionadas visualmente diferentes colônias de fungos, que foram alçadas com auxílio de uma alça de platina e inoculadas em novas placas Petri contendo novamente ágar Sabouraud. Cada colônia foi nomeada com letras do alfabeto em ordem crescente. As placas Petri contendo as amostras isoladas foram então levadas para estufa a 27°C por 5 dias.

4.3 Manutenção das culturas

As culturas obtidas foram mantidas por repique (com auxílio de uma alça de platina, inoculando novamente em placas Petri com 20 mL de meio ágar Sabouraud 4%), levadas para crescimento em estufa a 27°C por 5 dias e então armazenadas na geladeira, sendo esse processo repetido em intervalos de aproximadamente 30 dias.

4.4 Obtenção dos extratos intracelular e extracelular

Tanto na análise da atividade antibiótica quanto na análise da atividade citotóxica, foram utilizadas as amostras que visualmente aparentavam estar purificadas com sucesso, de modo que 11 fungos foram avaliados.

Inicialmente as amostras foram inoculadas em tubos estéreis de 15 mL, utilizando 10 mL de meio Sabouraud 4% líquido. Os tubos foram colocados em um agitador com rotação entre 100~150 RPM para crescimento em temperatura ambiente, de aproximadamente 25°C por 5 dias, obtendo melhor aeração do meio líquido. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos.

Após a centrifugação os sobrenadantes (denominados S1) foram depositados em novos tubos estéreis de 15 mL e armazenados no congelador a aproximadamente -20°C, para posterior análise dos compostos liberados no meio extracelular. O precipitado foi lavado utilizando H₂O estéril e novamente centrifugado. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 5 mL de Tampão fosfato-salino (PBS) 1X. As amostras foram então cuidadosamente homogeneizadas e então sonicadas a 95% de potência por um total de 5 minutos, realizando pausas a cada um minuto de sonicação para as amostras resfriarem.

Em sequência as amostras foram novamente centrifugadas à 3500 rpm por 15 minutos. Então os sobrenadantes (denominados S2) contendo compostos intracelulares solúveis obtidos pela lise celular durante a sonicação foram transferidos para tubos estéreis de 15 mL, e eles

juntamente com os tubos contendo os precipitados (denominados P) foram armazenados no congelador.

4.5 Análise antibiótica

Nessa análise foi utilizado o método de difusão em ágar, avaliando os extratos S1 e S2 dos 11 fungos purificados e usando 2 antibióticos como padrão para comparação, a penicilina (50.000 U/mL) e a canamicina (50 µg/mL). As bactérias utilizadas no antibiograma foram cepas não selvagens doadas pelo laboratório de Microbiologia do Campus Alto Paraopeba, sendo utilizada uma bactéria Gram positiva (*Bacillus Cereus*) e uma bactéria Gram negativa (*Klebsiella Pneumoniae*). Essas bactérias foram crescidas por 24 horas em meio LB líquido e então diluídas até a concentração correspondente ao 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), utilizando um espectrofotômetro a 600nm para determinar essa concentração.

No preparo do antibiograma, foram utilizadas placas Petri contendo 20mL de meio ágar LB, onde cada placa foi dividida igualmente em oito partes com auxílio de régua e um marcador permanente. As placas foram separadas em pares e as partes divididas foram numeradas em ordem crescente, uma de 1 a 8 e outra de 9 a 16, permitindo testar metade dos 11 fungos e os 2 antibióticos em cada uma (6 fungos na primeira e 5 na segunda). A cada dois pares de placas foi testado um dos extratos (S1 e S2), e alternadamente uma das bactérias (Gram positiva e Gram negativa), totalizando quatro pares de placas. Foi feito o inóculo de 100 µL de bactéria diluída e esses inóculos foram homogeneizados com auxílio de uma alça de Drigalski. Discos de papel filtro esterilizados (de 6mm de diâmetro) foram colocados em cada uma das oito partes das placas com auxílio de uma pinça estéril. Sobre cada disco foi adicionado 10 µL do extrato das amostras concentrado 20 vezes, sendo que os antibióticos foram adicionados usando 10 µL de canamicina e 5 µL de penicilina, sobre os dois últimos discos de cada placa. As placas foram transferidas para uma estufa a 37°C por aproximadamente 18 horas e depois analisadas.

4.6 Cultivo Celular

Para realizar a análise citotóxica dos extratos fúngicos obtidos, foram utilizadas células de mamífero (BHK-21) doadas pelo laboratório de Microbiologia da UFSJ- Campus Alto Paraopeba. Essas células são fibroblastos de linhagem contínua obtidas de rim de hamster (*Mesocricetus auratus*) recém-nascido, e foram cultivadas em garrafas de cultivo celular usando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% da solução antibiótica/antimicótica da Sigma-Aldrich®. As garrafas foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C, sendo repicadas a cada 3 dias.

4.7 Análise citotóxica

Na determinação de citotoxicidade dos extratos, as células BHK-21 foram adicionadas em todos os poços de uma microplaca de 96 poços, na concentração de 4×10^5 células/100µL/poço, em seguida foi adicionado mais 100µL/poço de meio DMEM com 2% de SFB e solução antibiótica/antimicótica. A microplaca foi levada para a estufa de CO₂ por 24 horas para proliferação celular. Após esse tempo o meio de cultivo dos poços foi trocado por meio novo e adicionou-se, em quadruplicatas, 10 µL/poço dos extratos fúngicos obtidos. Mantiveram-se 8 poços como controle negativo, sem adicionar extrato. A microplaca foi então levada novamente a estufa de CO₂ por 48 horas.

Ao final desse tempo, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (2 mg/mL em PBS) em cada poço, e a microplaca foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 90 min. Após a incubação foram adicionados 130µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) por poço, com a finalidade de dissolver os cristais de formazan formados. A placa foi levada a agitação por 10 minutos e as absorbâncias em cada poço foram determinadas em espectrofotômetro ($\lambda = 492\text{nm}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3 Isolamento das Culturas

A partir das amostras preparadas com solução salina, foram obtidas placas tanto com uma única colônia de fungo filamentoso quanto placas com diversos fungos diferentes. As placas com uma colônia foram mantidas enquanto que as placas com mais de uma colônia de fungo foram repicadas, isolando em novas placas os fungos presentes.

Algumas das placas obtidas apresentaram fungos com características macroscópicas semelhantes a outros que já estavam presentes, outras placas não cresceram mesmo após algumas tentativas de repique, e ainda três placas contendo fungos isolados foram perdidas em um acidente na geladeira do laboratório. Assim foram obtidos e mantidos com sucesso 26 fungos, com a nomeação listada na tabela abaixo:

Tabela 1 - Nomes dados aos fungos obtidos, definindo as iniciais de acordo com qual fonte foi utilizada, e em seguida as letras do alfabeto em ordem crescente são usadas para separar as diferentes colônias obtidas de uma mesma fonte, sendo seguido a essa letra um número em casos de mais fungos purificados de um isolado.

Fonte do isolamento	Amostras
Samambaias	FSM-C
	SM1-A
	SM1-C1
	SM1-C2
	SM1-D
	SM2-A
	SM3-A
	SM3-B
	CA-A
	CA-B
Cânion	CA-C
	CA-D
	CA-E
	CG-A
Crista de Galo	CG-B
	CG-C
	CG-E
	SN-B
Platô do Desejado	PD1-A
	PD2-A
	PD2-B
	PD2-C
	PD4-A
Fezes de caranguejo	PD5-B
	FDC-A
	FDC-B

Fonte: Própria.

As placas das culturas obtidas após o crescimento podem ser visualizadas nas figuras de 10 a 14.

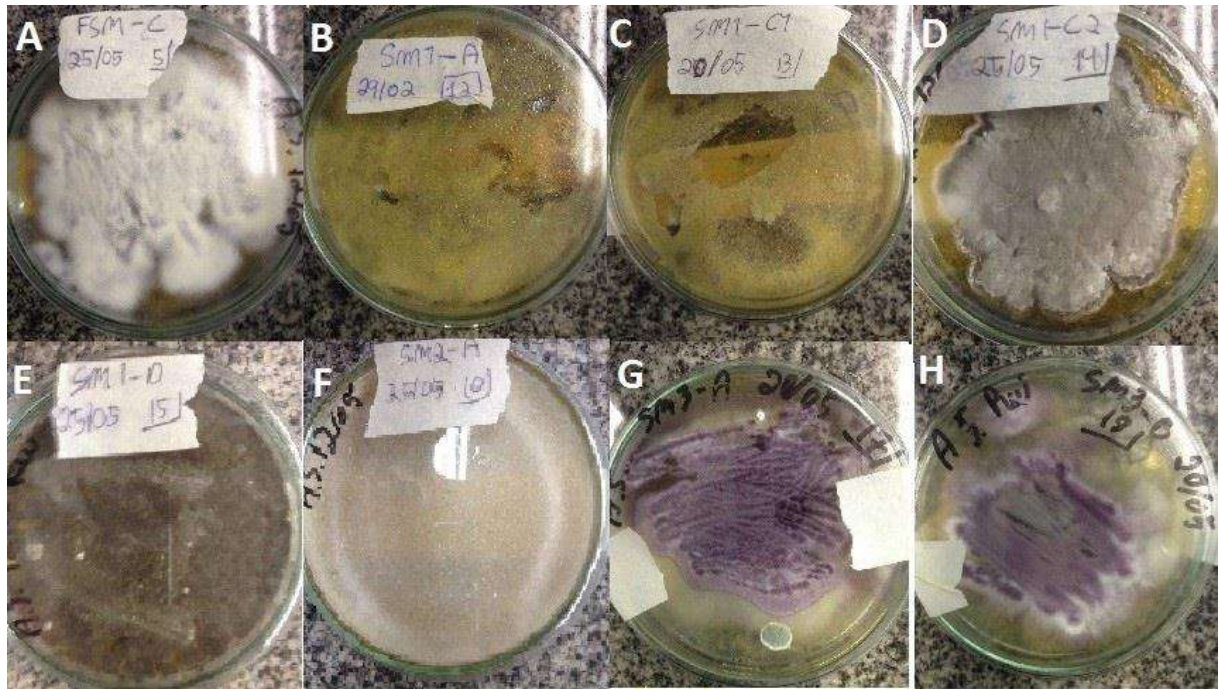


Figura 10 - Fungos isolados de samambaias, nomeados SM de 1 a 3 e FSM, os fungos isolados foram identificados como: A) FSM-C; B) SM1-A; C) SM1-C1; D) SM1-C2; E) SM1-D; F) SM2-A; G) SM3-A; e H) SM3-B.

Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

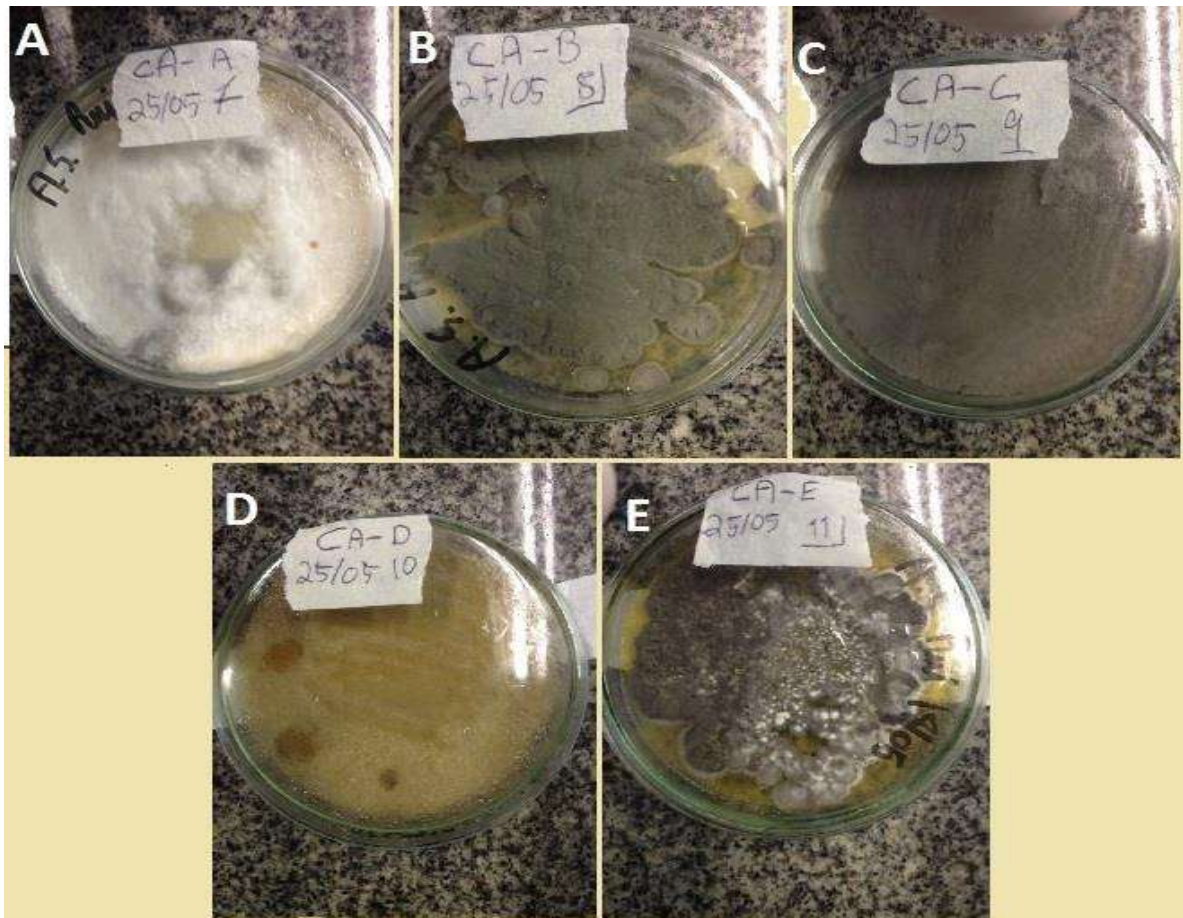


Figura 11 - Fungos isolados de um Cânion, nomeados CA, os fungos isolados foram identificados como: A) CA-A; B) CA-B; C) CA-C; D) CA-D; E) CA-E.

Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

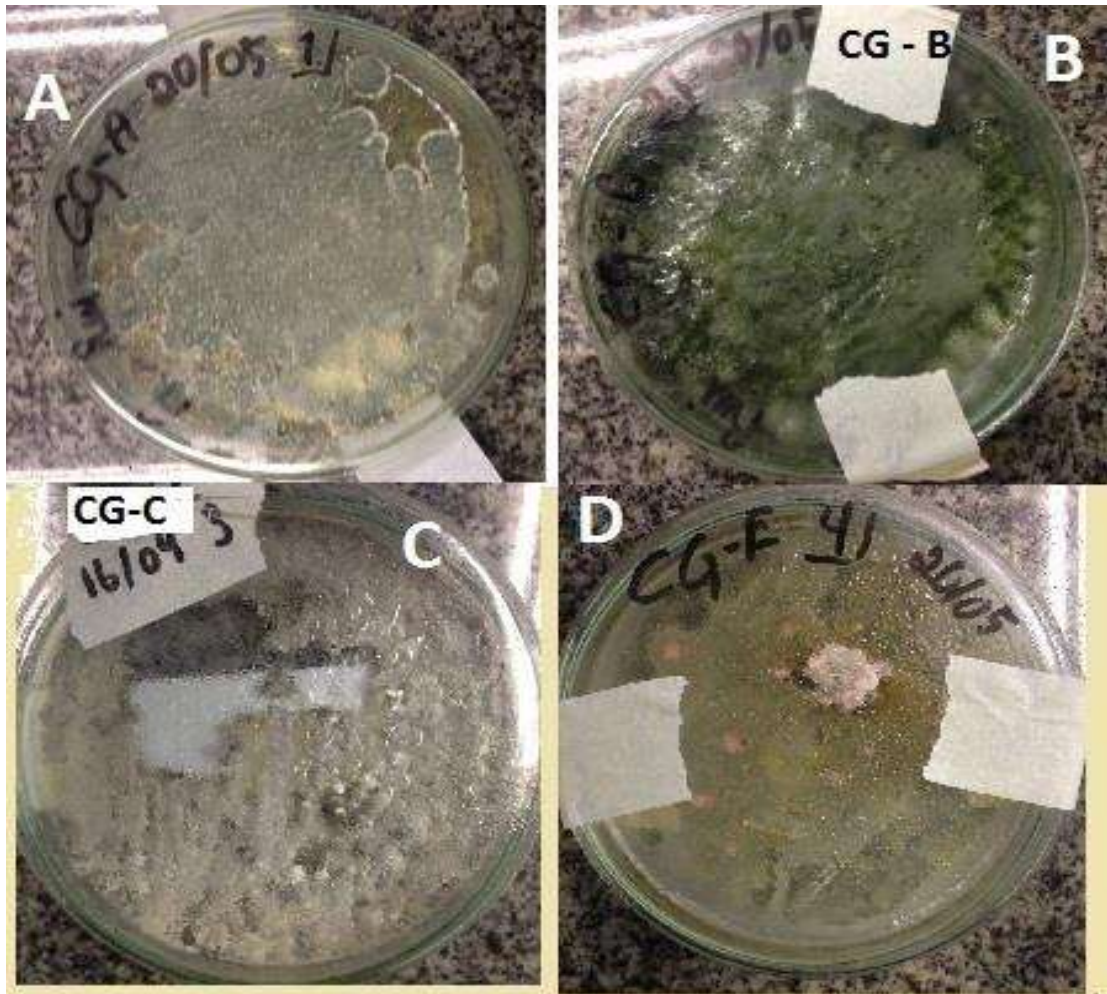


Figura 12 - Fungos isolados do platô Crista de Galo, nomeados CG, os fungos isolados foram identificados como: A) CG-A; B) CG-B; C) CG-C; D) CG-E.

Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

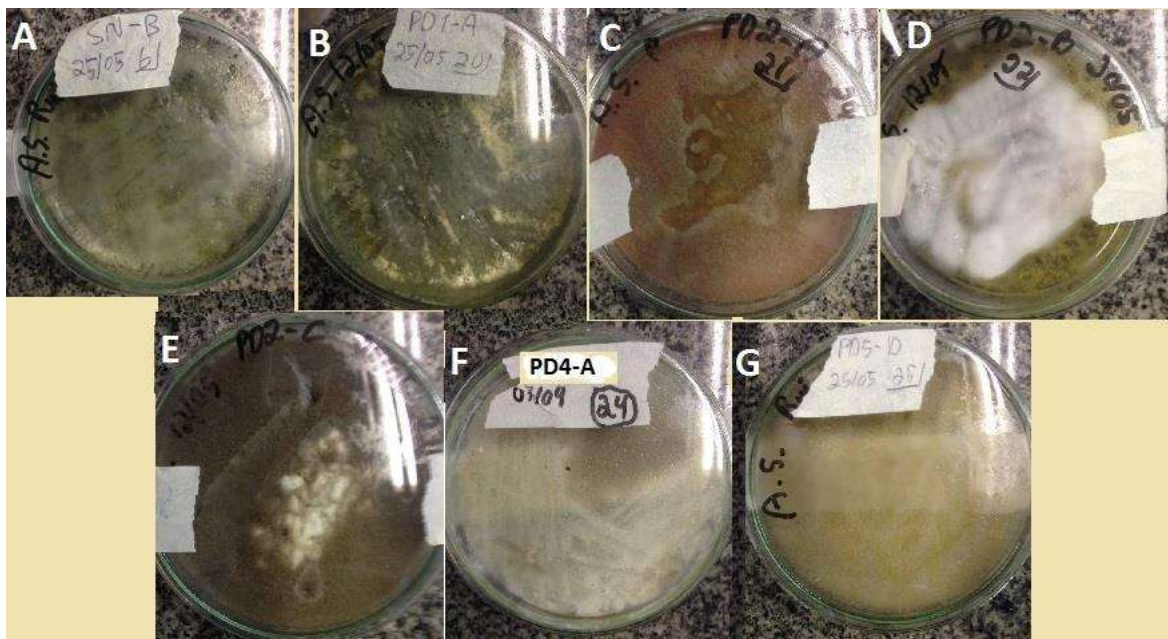


Figura 13 - Fungos isolados do platô do desejado, nomeados PD de 1 a 5 e SN, os fungos foram identificados como: A) SN-B; B) PD1-A; C) PD2-A; D) PD2-B; E) PD2-C; F) PD4-A; G) PD5-D.

Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

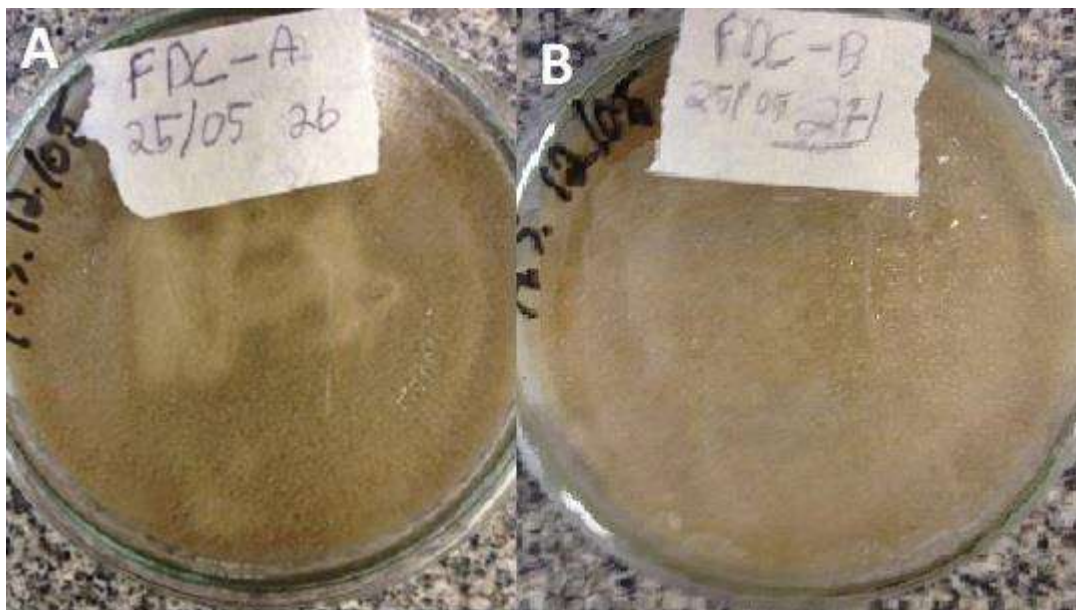


Figura 14 - Fungos isolados de fezes de caranguejo, nomeados FDC, os fungos foram identificados como: A) FDC-A; e B) FDC-B.

Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

Determinadas placas não apresentam culturas uniformes, e podem conter tanto um único fungo em etapas diferentes de desenvolvimento pela sua extensão, quanto fungos contaminados com outros fungos ou com bactérias (como na placa CG-E, contaminada atualmente com bactéria, e nas placas PD2-C e PD4-A, contaminadas com fungo). Possivelmente durante as repicagens para manutenção das colônias, pode ter ocorrido contaminação dessas placas em consequência tanto da esterilização ineficiente dos materiais utilizados quanto problemas relacionados ao mal funcionamento do fluxo laminar utilizado para a realização dos repiques.

Desse modo ainda se torna necessário realizar mais tentativas de repique, tentando isolar os fungos de partes diferentes das placas e por métodos diferentes. Ainda, em caso de continuidade das colônias não uniformes, seria necessário realizar uma análise do material genético e determinar a presença ou não de mais de uma espécie de fungo. Em casos positivos de presença de mais de um fungo, a dificuldade do isolamento pode ser explicada pela associação de fungos que crescem melhor em consorcio do que separadamente, ou simplesmente são fungos que não se inibem, onde um não prejudica o crescimento do outro.

5.2 Análise antibiótica

Os extratos dos onze fungos avaliados e os antibióticos usados foram adicionados nos discos de papel filtro de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Ordem das amostras inoculadas e antibióticos usados na análise da presença de atividade antibiótica, sendo definida como 6 fungos e os dois antibióticos na primeira placa do par, e 5 fungos e os dois antibióticos na segunda placa do par.

Amostra/antibiótico	Numeração nos discos
CG - A	1
CG - C	2
FSM - C	3
CA - A	4
CA - C	5
SM1 - A	6
SM1 - C2	9
SM1 - D	10
SM3 - A	11
SM3 - B	12
PD1 - A	13
Canamicina	7 e 14
Penicilina	8 e 15

Fonte: Própria.

Após 18 horas de crescimento na estufa, as placas Petri, presentes nas figuras de 15 a 18, foram avaliadas quanto à presença de halos de inibição.

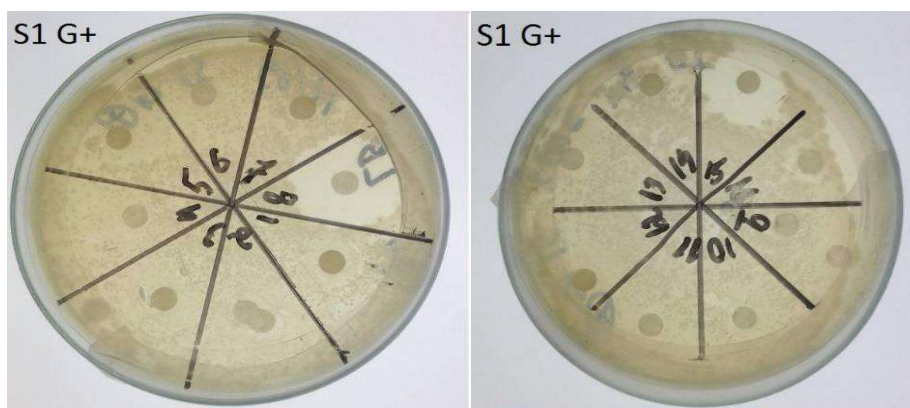


Figura 15 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 1 em bactérias Gram positivas.

Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

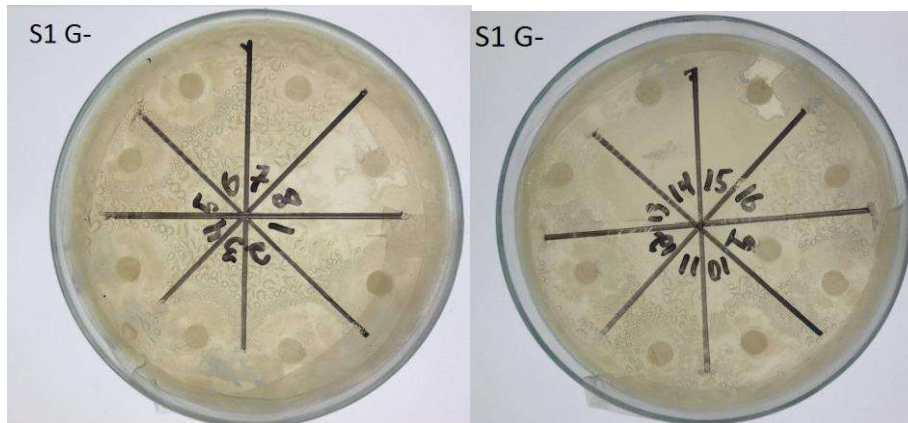


Figura 16 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 1 em bactérias Gram negativa.
Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

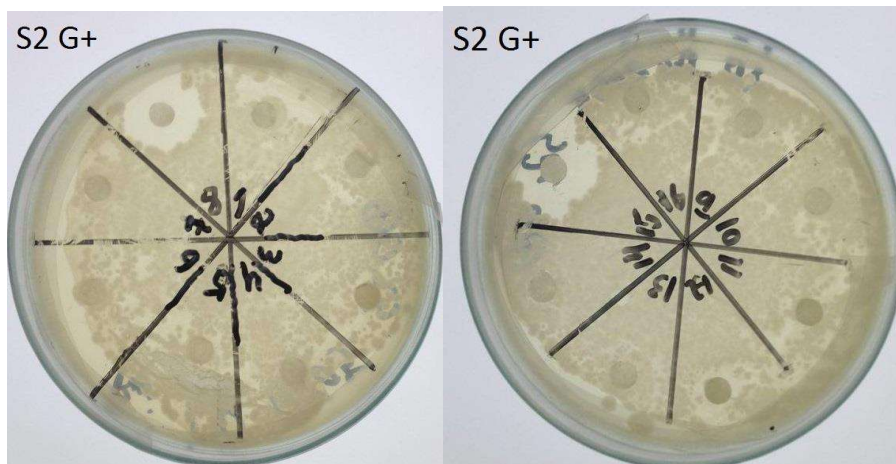


Figura 17 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 2 em bactérias Gram positivas.
Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

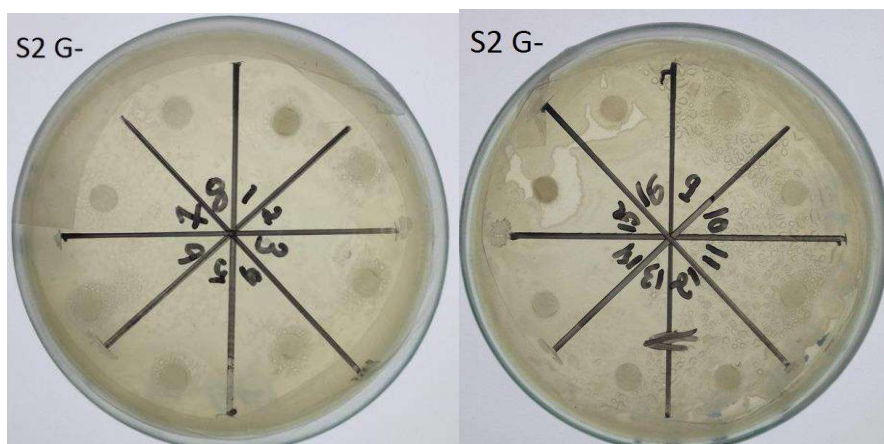


Figura 18 - Placas contendo a análise do extrato do sobrenadante 2 em bactérias Gram negativas.
Fonte: Montagem própria com fotos tiradas no laboratório.

Assim foi possível perceber que não houve inibição relevante nos ensaios, demonstrando que possivelmente nenhum dos extratos analisados possuía compostos com capacidade antibiótica nas amostras de material obtidas, visto que com exceção da primeira placa da figura 18, todas os ensaios apresentaram inibição por penicilina, confirmando a eficácia do método de

análise antibiótica por difusão em ágar. A ausência de halo para penicilina na primeira placa da figura 18 pode estar relacionada aos discos de papel filtro utilizados, pois alguns estavam grudados em pilhas de 2 ou 3 discos. Essas pilhas foram evitadas quando detectadas, entretanto alguma pode ter sido utilizada por descuido durante a preparação das placas, de modo que o volume de penicilina utilizado não foi suficiente para passar pelos discos e difundir no ágar. Ainda foi possível perceber que pode ter ocorrido erro na preparação da canamicina, visto que a mesma não apresentou atividade em nenhuma das análises, de modo que possivelmente não houve homogeneização suficiente durante a preparação da mesma, reforçando assim a necessidade futura de mais atenção ao preparar reagentes para experimentos.

Ainda, esse resultado negativo contrariou um resultado prévio anteriormente realizado, onde havia sido possível identificar um pequeno halo para as amostras SM3-A e SM3-B. Essa variação pode ser consequência de alguma diferença nos procedimentos aplicados, pois esse primeiro ensaio foi realizado com menos critério, para uma análise qualitativa rápida, onde não houve utilização de uma densidade específica de bactérias no inóculo, sendo realizado com culturas de bactérias crescidas por 24 horas a partir de amostras criopreservadas. Ou ainda pode ser relacionada à diferença de tempo entre as realizações dos experimentos, de mais de um ano, onde esses fungos podem ter tido seus genes relacionados a respostas antibióticas silenciados por algum mecanismo epigênico após um longo período de repiques sem contato com bactérias.

Como só foram avaliados os onze fungos que estavam purificados no início dos testes, desconsiderando os que estavam contaminados, ainda resta realizar a análise para os outros fungos a medida que for possível reisolar os mesmos. Ainda é possível alterar a metodologia utilizada, usando outros métodos de análise de atividade antibiótica, como o método das diluições em caldo ou o método da bioautografia, buscando assim variar alguns fatores que podem influenciar na resposta antibiótica.

5.3 Análise citotóxica

A numeração dos inóculos dos extratos nos poços seguiu a mesma ordem crescente da análise de atividade antibiótica, mas no caso sem pular o 7 e o 8, que nas placas foram destinados aos antibióticos, como pode ser visto na tabela 3.

Tabela 3 – Amostras analisadas em cada coluna da microplaca para realização do teste de atividade citotóxica.

Numeração da coluna na microplaca	Amostras
1	CG - A
2	CG - C
3	FSM - C
4	CA - A
5	CA - C
6	SM1 - A
7	SM1 - C2
8	SM1 - D
9	SM3 - A
10	SM3 - B
11	PD1 - A
12	Controle negativo

Fonte: Própria.

Além disso as quatro primeiras linhas da microplaca foram destinadas às quadruplicadas do extrato S1, enquanto as quatro ultimas foram destinadas às quadruplicatas do extrato S2. Assim, após a análise do espectrofotômetro, obtiveram-se os resultados expostos na tabela 4.

Tabela 4 - Absorbância inicial das amostras em quadruplicatas, de 1 a 11 as amostras de fungos avaliadas e na última coluna a absorbância dos poços onde não foi realizada a adição de extratos. Ainda as quatro primeiras linhas representam os extratos extracelulares e as quatro últimas linhas representam os extratos intracelulares dos fungos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Controle negativo
S1	0,591	0,827	0,829	0,756	0,796	0,77	0,838	0,794	0,732	0,662	0,611	0,814
	0,553	0,654	0,769	0,741	0,734	0,723	0,695	0,715	0,791	0,585	0,506	0,771
	0,531	0,697	0,693	0,83	0,698	0,741	0,808	0,738	0,796	0,65	0,636	0,882
	0,581	0,7	0,69	0,769	0,721	0,735	0,763	0,824	0,796	0,669	0,644	0,813
S2	0,507	0,692	0,708	0,755	0,752	0,802	0,841	0,752	0,832	0,631	0,742	0,885
	0,519	0,659	0,71	0,619	0,705	0,747	0,827	0,856	0,669	0,609	0,752	0,876
	0,538	0,702	0,631	0,714	0,754	0,914	0,746	0,905	0,658	0,606	0,71	0,839
	0,524	0,87	0,719	0,725	0,773	0,75	0,766	0,764	0,77	0,687	0,725	0,95

Fonte: Própria.

Nesse método de análise citotóxica, valores de absorbância inferiores ao valor do controle negativo indicam que ocorreu morte celular na amostra, pois quanto menor o valor, mais células foram mortas pela ação do extrato adicionado. Isso acontece, como dito anterior, em consequência do sal MTT que é desidrogenado pelas mitocôndrias de células ativas formando cristais que adquirem coloração ao serem dissolvidos pelo DMSO, aumentando a absorbância.

Os resultados obtidos a partir do experimento foram utilizados para elaborar o gráfico da figura 19, que mostra os valores de absorbância a 492nm dos ensaios realizados.

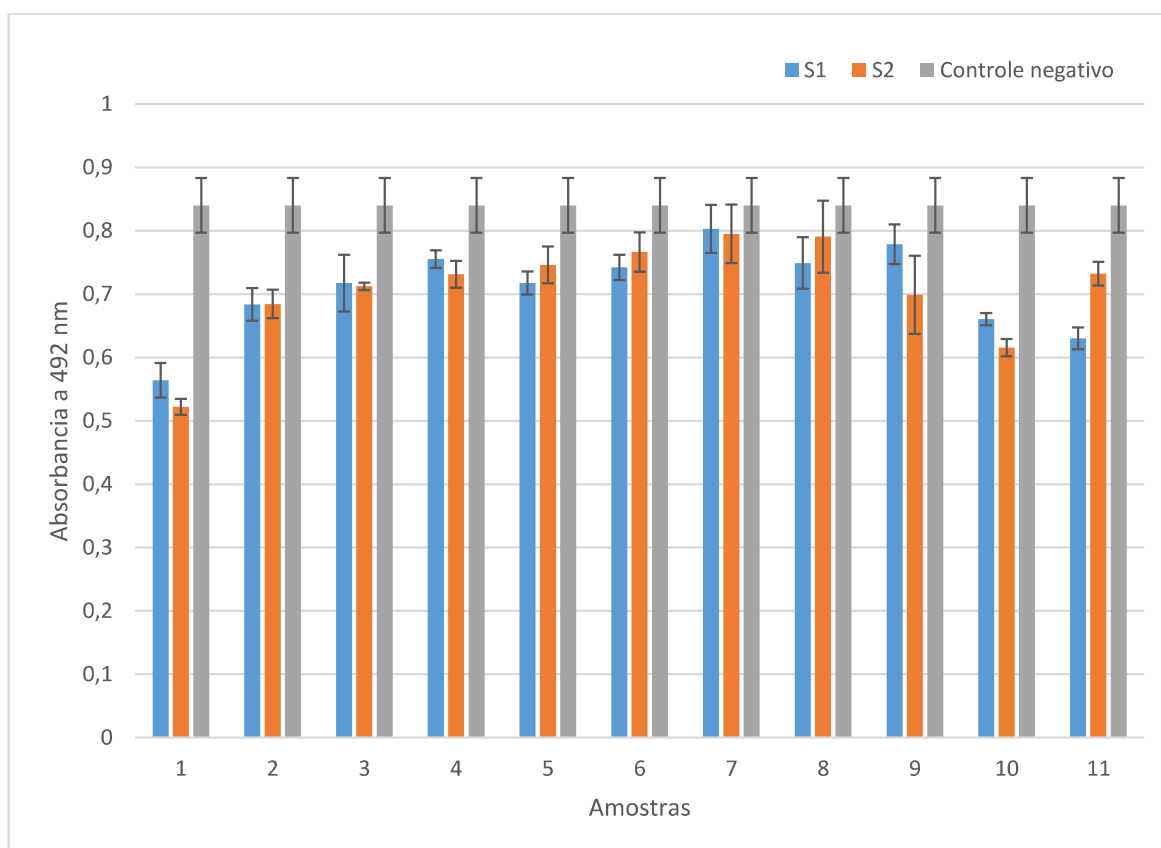


Figura 19 - Gráfico de barras da média das absorbâncias, contendo o desvio padrão, em comparação com controle negativo, onde valores inferiores ao controle correspondem a maior atividade citotóxica.
Fonte: Própria com auxílio do programa Excel 2013.

A partir dos resultados obtidos, foi realizada a análise de variância (ANOVA utilizando o programa Excel 2013) para cada um dos extratos (S1 e S2) como visto nas tabelas 5 e 6, testando a hipótese nula de que não houve diferença significativa de morte celular nos poços analisados, de modo que os extratos não possuem atividade citotóxica.

Tabela 5 - ANOVA para extrato relativo ao meio extracelular (S1), usando α igual a 0,05, permitindo identificar se existe ou não diferença de quantidade de células viáveis presentes nos poços da microplaca.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,218842	11	0,019894727	21,42221	8,83E-11	2,151197
Dentro dos grupos	0,026004	28	0,000928696			
Total	0,244846	39				

Fonte: Própria.

Tabela 6 - ANOVA para extrato relativo ao meio intracelular (S2), usando α igual a 0,05, permitindo identificar se existe ou não diferença de quantidade de células viáveis presentes nos poços da microplaca.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,307131	11	0,027921	26,08442	7,94E-12	2,151197
Dentro dos grupos	0,029971	28	0,00107			
Total	0,337102	39				

Fonte: Própria.

Desse modo foi possível verificar, tanto a partir do valor-P menor que α (de 0,05, ou seja 95% de confiança) para ambos os extratos, quanto da comparação do F com o F crítico tabelado, em que ambos os extratos apresentaram valores de F superiores a F crítico, que a hipótese nula pode ser rejeitada, de modo que houve diferença significativa de morte celular entre os fungos testados para ambos os extratos, comprovando assim que compostos presentes nos extratos de alguns fungos apresentaram atividade citotóxica.

Assim, para identificar com mais precisão quais fungos de quais dos extratos testados exibiram essa diferença estatística relevante nas médias da morte celular ao comparar com o controle negativo, foi realizado um Teste-t novamente através do programa Excel 2013, sendo que para isso novamente foi utilizado α como 0,05. A partir dos resultados, foi elaborada a tabela 7, onde encontra-se os valores de t e o valor-P para cada fungo de cada extrato. O valor de t crítico tabelado é 4,302653 e foi informado pelo Excel.

Tabela 7 – Tabela contendo os valores de t e o valor-P para cada um dos extratos de cada fungo, onde o valor-P é comparado com o alfa de 0,05 e t é comparado com o valor tabelado de t crítico, que é de [4,302653].

Fungo	Extrato	Valor-P	t
CG-A	S1	0,004003	-8,05061
	S2	0,007792	-11,262
CG - C	S1	0,026831	-5,98143
	S2	0,022791	-6,51021
FSM - C	S1	0,195483	-1,91565
	S2	0,06504	-3,72721
CA - A	S1	0,11082	-2,74827
	S2	0,142945	-2,35249
CA - C	S1	0,134503	-2,44352
	S2	0,057344	-3,99415
SM1 - A	S1	0,133841	-2,451
	S2	0,279918	-1,4676
SM1 - C2	S1	0,571813	-0,67008
	S2	0,600855	-0,58295
SM1 - D	S1	0,184715	-1,99113
	S2	0,65306	-0,52314
SM3 - A	S1	0,290883	-1,42229
	S2	0,007633	-11,3806
SM3 - B	S1	0,050513	-4,27899
	S2	0,027461	-5,90946
PD1 - A	S1	0,031299	-5,51885
	S2	0,189856	-1,95438

Fonte: Própria.

Com essa tabela foi observado quais fungos apresentaram valores de módulo de t maiores que o t crítico e valor-P menor que 0,05. Assim vemos que somente alguns fungos apresentaram ação citotóxica estatisticamente relevante. Os fungos denominados CG-A e CG-C apresentaram ação citotóxica tanto para o extrato intracelular quanto para o extrato extracelular, gerando a possibilidade de que o composto com atividade citotóxica possa estar presente tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular, permitindo assim uma obtenção mais fácil do extrato diretamente pelo meio extracelular. Desse modo, esses fungos se tornam uma fonte promissora de estudos futuros para melhor quantificação desse efeito através de testes variando a concentração do extrato e a caracterização dos compostos responsáveis por ele, através de ciclos de purificação e novas análises de atividade citotóxica. Obtendo os compostos purificados é possível realizar testes mais precisos de citotoxicidade e avaliar a possibilidade de utilizar esses compostos no tratamento do câncer.

A amostra SM3-B apresentou ação citotóxica para o extrato intracelular, mas para o meio extracelular a hipótese de que não houve diferença significativa entre a quantidade de células ativas comparando com o controle negativo foi aceita. Os fungos SM3-A e o PD1-A também

apresentaram ação citotóxica relevante para os extratos intracelular e extracelular respectivamente. Assim também se torna necessário realizar mais avaliações desses extratos, para identificar com mais precisão a ação citotóxica, variando concentrações e possivelmente melhorando estatisticamente o método ao incluir compostos com atividade citotóxica conhecida, para utilização desses como controle positivo. Desse modo, em geral, percebe-se que o método foi aplicado com eficácia, restando realizar novos testes para os fungos que não foram avaliados.

6 CONCLUSÃO

A partir desse trabalho é possível reafirmar a importância da bioprospecção, no caso, de fungos filamentosos, para o desenvolvimento de novos produtos com aplicações medicinais, como antibióticos e agentes citotóxicos, visto que a imensa diversidade genética presente em nosso país faz esses organismos serem fontes extremamente promissoras de compostos bioativos. Assim, apesar de não ter sido possível identificar ação antimicrobiana nos fungos avaliados, o experimento mostrou-se fácil de aplicar e com resultados diretos, a partir da comparação da ação de antibióticos conhecidos (como a penicilina) com os extratos que se deseja analisar. Ressaltamos ainda a necessidade de realizar a análise dos fungos que ainda precisarão ser purificados, e possivelmente alterar a metodologia aplicada, buscando resultados mais precisos.

Quanto à ação citotóxica, o experimento também pode ser considerado relativamente simples, apresentando resposta em pouco tempo. Assim foi possível identificar a presença de atividade citotóxica considerável para o fungo CG-A, além de outras amostras que também apresentaram uma possível atividade ao se considerar os desvios padrões apresentados. Entretanto para se realizar uma análise mais precisa, será necessário fazer mais ensaios e possivelmente utilizar um controle positivo, além de variar as concentrações de extratos, obtendo assim resultados mais detalhados.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, C.M.A. **BIOPROSPECÇÃO**: Coleta de Material Biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Nº 17. 2ªed. São Paulo: CETESB, 2003.

BERGERS, G.; HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. **Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis**. The International Journal of Developmental Biology, USA, v.42, p.995-1002, 1998.

CARDOSO, A.L.G. **Prospecção de fungos filamentosos produtores de xilanases e/ou celulases para realização de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 33f. Tese (graduação) – Bacharelado em Engenharia Ambiental, Faculdade COC, 2011.

DAVID, L.E. **Avaliação das atividades citotóxica, antifúngica e do potencial de segurança in vivo de ar-turmerona (Curcuma longa L.)**. 70f. Tese (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas, UNICENTRO, 2013.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J.L. **Fungos**: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ªed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. KUBY **Imunologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002, p.539-540.

GUIMARAES, L.H.S.; PEIXOTO, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIN, V.C.; ZANOELO, F.F.; JUNIO, A.B.; POLIZELLI, M. L.T.M. **Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 37, p. 474-480, 2006.

MANSO, S.B.G.; TENENTE, R.C.V. **Nematoides (Heterodera glycines Ichinohe) formador do cisto da soja**. Brasília: Embrapa. 5p. (Comunicado Técnico), 1984.

MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. **Tecnologia do cultivo de células animais**: de biofármacos a terapia gênica – São Paulo; Roca 2007.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival**: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63. 1983.

NASCIMENTO, R.F.Q.; SOUSA, B.L.P.; BEZERRA, R.M.S.; CALVALCANTI, R.M.F.; SILVA, R.B.; QUEIROZ, J.C.F. **Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos**. REVISTA SAÚDE E CIÊNCIA *On line*, 2014; 3(3):76-85, set-dez, 2014.

OLIVEIRA, V.M. de; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos**. Revista MultiCiencia: Construindo a História dos Recursos Naturais, n.7, 2006.

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

PALMA, C.M., PALMA, M.S.; **Bioprospecção no Brasil: Análise crítica de alguns conceitos**. Cienc. Cult., vol.64, no.3, São Paulo, 2012.

PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; TAKETANI, R.G. **Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável**. In: Itamar Soares de Melo; João Lúcio Azevedo. (Org.). Microbiologia Ambiental - 2 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 83-106, 2008.

SILVA R.R.; COELHO, G.D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**; IBt, Jardim Botânico de São Paulo, 2006.

SOUTO, J.R., **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de *Piper* (Piperaceae) por bioautografia**. Campina Grande, 2014

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. **Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica**. Quim. Nova, Vol. 31, No. 7, 1807-1813, 2008

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 6ªed., Porto Alegre: Artmed, 2002.