



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE - FACES
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

KLÉBER DE SOUSA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS PROVENIENTES
DE FUNGOS ISOLADOS DO SOLO.**

BRASÍLIA
2013

KLÉBER DE SOUSA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS PROVENIENTES
DE FUNGOS ISOLADOS DO SOLO.**

Trabalho de conclusão de curso, Apresentado no formato de artigo Científico ao UniCEUB como requisito parcial para conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina.

Orientador: Prof. Ph.D. Paulo Roberto Queiroz.
Co-Orientador: Prof. Ph.D. Octávio Luiz Franco.

BRASÍLIA
2013

“A ti Senhor, toda honra e toda a glória”.

Atividade antimicrobiana de metabólitos provenientes de fungos isolados do solo.

KLÉBER DE SOUSA OLIVEIRA*; OCTÁVIO LUIZ FRANCO **; PAULO ROBERTO
QUEIROZ***

Resumo:

Os microrganismos vêm sendo intensamente estudados para aquisição de metabólitos com atividades antimicrobianas e, com o aumento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, a pesquisa para aquisição ou seleção de novas moléculas bioativas se torna imprescindível. Os fungos vêm recebendo destaque nesse grupo desde a descoberta da penicilina derivada do fungo *Penicillium chrysogenum*. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos presentes no solo da região de Brasília-DF com atividade antibacteriana. A partir dos testes preliminares de antibiose em placa foram selecionados dois isolados de fungos com provável capacidade antimicrobiana. Os fungos foram identificados por meio de características microscópicas, macroscópicas e pela amplificação da região intergênica transcrita (ITS). Os dois isolados foram identificados como *Penicillium citrinum* com identidade de 100% quando alinhadas com sequências do banco de dados Genbank. Ambos os *P. citrinum* foram cultivados sob fermentação em estado líquido, em seguida separada a parte líquida da parte celular, a parte líquida foi liofilizada e seus extratos foram testados pelo método de microdiluição em caldo “US National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), contra as bactérias Gram positivas *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, Gram negativas *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* ATCC 8730, onde foi alcançada a capacidade de inibir em até 100% todas as bactérias testadas, quando confrontada contra o filtrado 2. Os resultados confirmam o potencial antimicrobiano apresentado pelos fungos que foram isolados do solo, existindo a possibilidade em isolar metabólitos antibacterianos a partir desses fungos estudados.

Palavras-chave: Fungos do solo; Metabólitos; *Penicillium citrinum*; atividade antibacteriana.

* Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

** Biólogo, Doutor em Biologia Molecular pela Universidade de Brasília, UNB, Brasil. Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Coordenador do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, Brasil.

*** Biólogo, Doutor em Biologia Animal pela Universidade de Brasília, UNB, Brasil. Professor do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos

Os fungos são organismos eucariotos pertencentes ao reino Fungi, possuem características particulares que os distinguem dos organismos procariotos, tais como, o maior tamanho das células e a presença de núcleo, vacúolo e mitocôndria. Possuem parede celular constituída de quitina (exceto alguns fungos aquáticos); não realizam fotossíntese; alimentam-se por absorção de nutrientes previamente digeridos por enzimas extracelulares; e se reproduzem, sexuada ou assexuadamente, por esporos. Suas células podem apresentar um só núcleo ou serem multinucleadas, possuem vida independente e não se reúnem para formar tecidos verdadeiros. Podem tolerar amplas faixas de temperatura, pressão e pH e podem se desenvolver em meios com baixo teor de nutrientes, podendo utilizar quase todo o tipo de carbono como fonte de energia (ALEXPOULOS *et al.*, 1996; MADIGAN *et al.*, 1997).

A generalização de características dos fungos apresenta extrema dificuldade devido à diversidade ecológica, fisiológica e morfológica dentro do Reino Fungi, no qual são reconhecidos três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros considerados fungos microscópicos e o último macroscópico. Constituem um reino muito grande e heterogêneo, sendo encontrados virtualmente em qualquer nicho ecológico. Em um levantamento realizado, estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas, sendo que destas apenas foram descritas cerca de 74.000. Excluindo-se os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes (JIANG; AN, 2000; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; ARCHER *et al.*, 2008).

Diversos fungos são conhecidos por terem impactos negativos no bem estar humano como agentes que causam doenças em plantas, na biodegradação e como patógenos de animais, tanto como produtores de micotoxinas quanto como causadores de micoses. Porém, entre as espécies microscópicas, os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Saccharomyces* são os mais conhecidos por seu impacto positivo para humanos (BENNETT, 1998).

Microrganismos podem ser utilizados como fonte de agentes ativos, uma vez que, produtos naturais tem um papel importante no desenvolvimento de fármacos

para o tratamento de doenças em humanos. Os fungos, em particular, são importantes fontes de novos metabólitos com pronunciada atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral. Uma grande vantagem da prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes consiste no fato de que esses microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como podem ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais, nem problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais. Entre os fungos microscópicos, certos gêneros como *Aspergillus* e *Penicillium*, conhecidos por sua ubiquidade e caracterizados geralmente pela formação abundante de esporos, tem sido utilizados para a busca de compostos bioativos, sendo que de aproximadamente 6.500 metabólitos bioativos de fungos microscópicos, mais de 30% foram obtidos destes dois gêneros (TAKAHASHI; LUCAS., 2008; SILVA *et al.*, 2009; SURYANARAYANAN *et al.*, 2009).

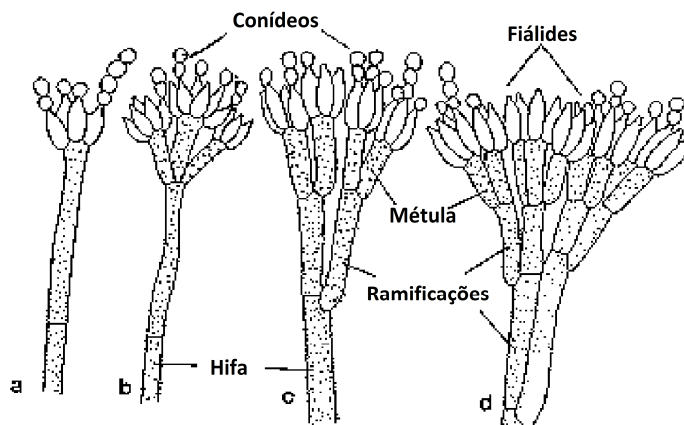
1.2 Aspectos gerais do gênero *Penicillium* sp.

O gênero *Penicillium* consiste em um gênero, descrito por Link, em 1809. Os indivíduos desse gênero apresentam crescimento rápido, com tempo de maturação por volta do terceiro ou quarto dia. Na macromorfologia, as colônias apresentam, em um primeiro momento, uma textura algodonosa baixa ou veludosa, de tom branco, que rapidamente se torna de coloração amarelo-alaranjada, amarelo-esverdeada, verde, ou azul-esverdeada, sendo esses três últimos tons os mais frequentemente observados. O reverso varia do castanho-amarelado ao castanho-avermelhado, podendo esse pigmento ser difusível ou não no meio. Pode-se suspeitar de uma espécie, *Penicillium marneffe*, que foi recentemente envolvida em infecções sistêmicas, se for detectado pigmento vermelho-vinho no Agar (SIDRIN; ROCHA, 2004; KONEMAN *et al.*, 2008).

A micromorfologia (Figura 1) das colônias evidencia grande número de hifas hialinas septadas, com conidióforos simples ou ramificados, solitários ou agrupados, hialinos ou ligeiramente pigmentados. As células conidiogênicas tem a forma de uma garra (fiálides), e os conídios são esféricos, de tamanho regular, e coram igualmente, representando um tipo acrópeto de conidiação na qual conídios

idênticos são produzidos em sequência a partir da extremidade no conídio previamente formado (SIDRIM; ROCHA, 2004; KONEMAN *et al.*, 2008).

Figura 1. Estruturas morfológicas e tipos de conidióforo ramificação em *Penicillium*. a) simples, b) uma fase ramificada, c) duas fases ramificadas, d) três fases ramificadas



FONTE: SAMSON *et al.*, 1984, com adaptações.

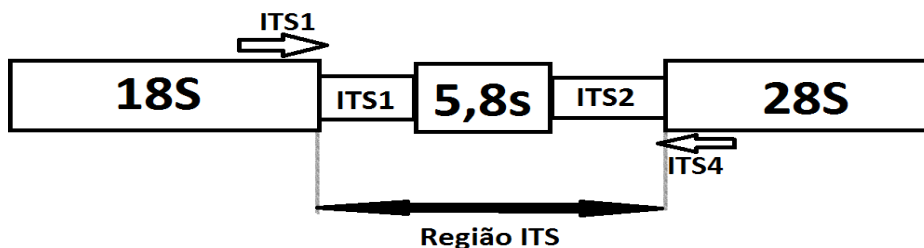
1.3 Identificação Fúngica

Tradicionalmente, a identificação de fungos filamentosos está baseada principalmente em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. No entanto esse método exige tempo e experiência para identificar fungos pelos métodos convencionais, métodos mais específicos para identificação fúngica podem ser utilizados, como: técnicas de biologia molecular utilizando sequências de DNA ribossomal (DNAr); espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF ICMS (*Matrix Assisted Laser Description/Ionization Time-of-Flight Intact Cell Mass Spectrometry*); SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida) para determinar perfis protéicos; métodos imunológicos; e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (BUGNI; IRELAND, 2004; HORISAWA *et al.*, 2009; WACULICZ-ANDRADE, 2009; SANTOS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010a).

A identificação molecular no grau de espécie tem sido baseada, na maioria das vezes, no uso da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossômico. O DNA que codifica o RNA ribossomal apresenta-se como *cluster* gênico, no qual tem-se o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Esses genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2 (Figura 2), as quais são transcritas e processadas para

dar origem ao RNA ribossômico maduro. O fato desse *cluster* gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou, até mesmo, variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de sequências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos (FUNGARO, 2000; MICHAELSEN *et al.*, 2006).

Figura 2. Representação esquemática da região ITS que inclui ITS1, ITS2 e rDNA 5,8S. ITS1 e ITS4 representam os iniciadores universais.



1.4 Metabólitos primários e secundários

Metabólitos primários são as pequenas moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo. São usadas em indústrias alimentícias e de ração incluindo alcoóis (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido 5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantana), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflavina, cianocobalamina, biotina) (DEMAIN, 2000; RAJASEKARAN *et al.*, 2008).

Metabólitos secundários são diferenciados dos primários por não participarem das reações básicas fundamentais à sobrevivência dos microrganismos. São produzidos na fase estacionária, porém, também podem ser sintetizados durante o

crescimento, são frequentemente bioativos e de baixa massa molecular (VINING, 1986; KELLER *et al.*, 2005).

Produtos de metabólitos secundários são reconhecidos em diversos seres vivos. As plantas produzem variados metabólitos secundários com variadas funções, como proteção a predadores e pigmentos importantes para a reprodução. Insetos produzem metabólitos para comunicação ou proteção. Os fungos são grandes produtores de metabólitos secundários como diversos tipos de enzimas e até mesmo antibióticos (VINING, 1986).

Compostos pertencentes ao metabolismo secundário são geralmente formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários são acumulados, tais como, aminoácidos, acetato, piruvato e outros. Metabólitos secundários apresentam características como distribuição taxonômica restrita, nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir determinado metabólito, não são essenciais para o crescimento e reprodução do organismo, condições de cultivo, especialmente a composição do meio, controlam a formação desses metabólitos; são produzidos como um grupo de estruturas intimamente relacionadas; podem ser superproduzidos e são codificados por conjuntos de genes dispensáveis. (JAY, 2005; KELLER *et al.*, 2005; MARTÍN *et al.*, 2005; YU; KELLER, 2005; NIGAM, 2009). Exemplos de metabólitos secundários usados na prática clínica atualmente estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Metabólitos secundários e suas respectivas funções.

Metabólito secundário	Fungo produtor	Principal utilização
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Antibacteriano
Alcalóides de Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Tratamento para enxaqueca
Cefalosporina	<i>Acremonium Chrysogenum</i>	Antibacteriano
Ciclosporina	<i>Tolypocladium nivenum</i>	Imunossupressor
Giberelina	<i>Fusarium moniliforme</i>	Hormônio de crescimento de plantas
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Antifúngico
Lovastatina	<i>Monascus ruber, A.terreus</i>	Hipocolesterolemiantes

Fonte: BENNETT, 1998; JIANG; NA, 2000; MEYER, 2008, com adaptações.

1.5 Fármacos provenientes de fungos

O grande momento da descoberta de compostos fúngicos com atividade antimicrobiana aconteceu em 1929 com a descoberta da penicilina por Sir Alexandre Fleming, a qual foi consolidada apenas na década de 40 com seu uso em humanos. No decorrer dos anos, muitos compostos, à princípio estudados por sua atividade antimicrobiana, foram comercializados ou potencialmente úteis como antitumorais, imunossupressores, antiparasitas, entre outros. A ciclosporina A e a ergotamina são exemplos de compostos fúngicos que atualmente são comercializados como fármacos, mas que inicialmente foram estudados com outros propósitos. A ciclosporina A, comercializada como imunossupressor em transplantes de órgãos, foi inicialmente isolada do fungo *Tolypocladium inflatum* por sua atividade antifúngica. Já a ergotamina, usada no tratamento de enxaquecas, foi obtida a partir de fungos do gênero *Claviceps*, sendo descrita também como uma micotoxina causadora do ergotismo em humanos e animais (DEMAIN, 1999; BUGNI; IRELAND, 2004).

Apesar dos interessantes compostos obtidos a partir de fungos, que chegaram a ser comercializados como fármacos ou serviram de modelo para síntese química o aumento do interesse das indústrias farmacêuticas por moléculas bioativas produzidas por esses microrganismos ocorreu nas últimas décadas com a descoberta das estatinas, substâncias capazes de controlar a taxa de colesterol plasmático. A compactina (mevastatina) foi isolada em 1975 a partir do fungo *Penicillium brevicompactum* e despertou o interesse dos pesquisadores visto à possibilidade de inibição da produção de colesterol, pois mimetiza um intermediário envolvido em sua biossíntese, inibindo competitivamente a enzima envolvida no processo. Com a continuidade dos estudos, um homólogo da compactina, a lovastatina (Mevacor®), foi isolada a partir de culturas de *Monascus ruber* e de *Aspergillus terreus*. Posteriormente foi sintetizado um análogo da lovastatina, a simvastatina (Zocor®), que ingressou no mercado como primeiro fármaco antilipêmico (ou anticolesterolêmico) sintético. Em 1993, a Pfizer, empresa farmacêutica de grande porte, lançou a atorvastatina (Lipitor®) e, em 2003, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a rosuvastatina (Crestor®), outro fármaco da classe das estatinas. Liderando a lista dos dez medicamentos mais vendidos no mundo no ano de 2004 os quais totalizaram vendas superiores a 50 bilhões de

dólares estão os redutores de colesterol Lipitor®, com 12 bilhões de dólares em vendas, e o Zocor®, com cerca de 6 bilhões de dólares em vendas (BASTOS, 2005; VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

1.6 Antimicrobianos

Dentro dos grupos de metabólitos secundários produzidos por fungos, os antimicrobianos, ou também chamados de antibióticos, são os precursores mais conhecidos atualmente. Esta notável classe de compostos formam um grupo heterogêneo de moléculas biologicamente ativas com diferentes estruturas e modos de ação. Atuam sobre DNA, RNA, síntese de proteínas, na função da membrana plasmática, no transporte de elétrons, esporulação, germinação e muitos outros alvos (DEMAIN, 2000). Tudo que evita ou danifica o encontro da droga antimicrobiana com seu “alvo” (receptores de penicilina, unidade 30S e 50S dos ribossomos, enzimas responsáveis pela síntese de parede celular, síntese de DNA e de mRNA, entre outros) gera maior ou menor resistência. Os alvos geralmente são proteínas, quase sempre enzimas importantes para o metabolismo da célula bacteriana. Assim, quanto mais específico e estratégico para a célula for o alvo, mais eficaz será a droga (SOUZA, 1998).

Após a descoberta da penicilina, entre outros agentes antimicrobianos, levantou-se a hipótese de que doenças infecciosas poderiam ser erradicadas. Porém, isso não foi verdadeiro, infecções continuam sendo a principal causa de morte em todo mundo. A eliminação dessas doenças tem sido dificultada por diversas razões como: a descoberta de novos patógenos transmitidos; microrganismos conhecidos portadores de determinadas mutações estão sendo selecionados para formas mais virulentas; seleção de resistência aos antibióticos; presença de fármacos mais potentes causando efeitos prejudiciais aos pacientes; dificuldade na adesão em determinados tratamentos farmacológicos; pacientes com doenças crônicas que apresentam um sistema imune debilitado; falta de tratamentos farmacológicos não tóxicos e efetivos (ECKERMAN; GRAHAN, 2000).

A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para a humana e vice-versa

(NIJTEN *et al.*, 1993). Mecanismos de resistência aparecem porque o genoma bacteriano é extremamente dinâmico, embora pequeno. Em geral as atividades essenciais de uma bactéria são codificadas por um só cromossomo, e as não-essenciais, como a defesa contra drogas e a transferência gênica, que levam a recombinação, são codificadas por elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons), que não fazem parte do cromossomo (SOUZA, 1998).

A evolução da resistência a antibióticos e outras drogas antimicrobianas foi, é e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos (SOUZA, 1998).

Novas metodologias para o desenvolvimento de novos antimicrobianos têm sido desenvolvidas. Porém, existem somente poucos novos antibióticos sendo produzidos pelas indústrias farmacêuticas atualmente. Portanto, a busca por novos antibióticos continua, a fim de combater patógenos emergentes, bactérias resistentes, fungos resistentes e microrganismos previamente suscetíveis que desenvolveram resistência (DEMAIN; ADRIO, 2008; LUCAS, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Desta forma o trabalho aqui apresentado, objetivou o isolamento de fungos com atividade antimicrobiana do solo presente no Cerrado a partir de uma única coleta de solo. Em seguida, os objetivos específicos foram: avaliar o potencial antimicrobiano dos diferentes extratos brutos obtidos e determinar o perfil químico de cada amostra obtida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foi coletada uma pequena amostra de solo com massa aproximada de 30 g da região administrativa Vicente Pires, situada no Distrito Federal, capital da República Federativa do Brasil (15°50'08,11"S 48°00'16,89"W). A amostra foi preparada adicionando-se 1 g da fração do solo coletada em 0,9 mL de solução salina autoclavada, misturada em agitador por 2 min na velocidade 8 rpm.

2.2 Cultivo e isolamento fúngico

O cultivo inicial do material foi realizado retirando-se 1 mL da solução previamente preparada, em ágar batata dextrose (BDA) (infusão de batata 200 g.L⁻¹, dextrose 20 g.L⁻¹ e ágar 15 g.L⁻¹) distribuído e solidificado em placa de Petri estéril com diâmetro de 150 mm, sendo o meio de cultura preparado de acordo com as especificações do fabricante (Himedia), e esterilizado em autoclava vertical a 120 °C por 20 min.

Após a aplicação das amostras, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 27 ± 2 °C por 7 dias. Com o intuito de isolar as espécies fúngicas foi feito um novo repique retirando com uma alça descartável estéril fragmentos das duas colônias, sendo feito cada um em placas separadas e com alças novas.

2.3 Identificação dos isolados fúngicos

A identificação dos fungos foi feita analisando-se o aspecto macroscópico, microscópico da colônia e por amplificação da região intergênica transcrita (ITS).

Para análise da macromorfologia, foi realizada cultura dos respectivos fungos em ágar BDA a 28 °C por 7 dias, após esse período foi avaliada a textura da colônia, sua tonalidade no verso e reverso e a presença ou não de estruturas aéreas. Na micromorfologia, foi realizado microcultivo em placa de Petri de 90 mm, cortando-se um pedaço do ágar BDA posicionado em cima de uma lâmina de vidro, com o auxílio de uma alça descartável de 10 µL inoculou-se cada fungo em um pedaço diferente

de ágar, posteriormente foi colocada uma lamínula sobre o inóculo e colocados em placas de Petri diferentes contendo dois pedaços de algodão umedecidos com água estéril. A placa foi incubada a 28 °C por 7 dias, após esse período a lamínula foi desprendida do pedaço de ágar e colocada em uma nova lâmina adicionando-se o corante lactofenol azul de algodão (ácido láctico 1000 g.L⁻¹, fenol 1000 g.L⁻¹, glicerina 1000 g.L⁻¹, azul-algodão 2,5 g.L⁻¹) para visualização das estruturas microscópicas em microscópio óptico (NIKON, Japão) utilizando-se o aumento de 400x (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Para a identificação molecular por ITS, os fungos foram cultivados primeiramente em ágar BDA a 28 °C por 7 dias, após esse período foi transferido três pedaços de 8 mm do fungo para 2 frascos de 250 mL contendo caldo BHI estéril para cada fungo e cultivado por 7 dias a 28 °C em agitação orbital a 300 rpm, após esse período o material foi centrifugado e a parte celular foi coletada para extração do DNA e realização das PCR's.

2.4 Extração do DNA fúngico

A extração do DNA de cada fungo foi procedida de igual forma, sendo esta realizada, macerando a parte celular com nitrogênio líquido (NL2), transferindo 200 mg do macerado celular para um tubo de 1,5 mL, em seguida foi adicionado 500 µL do tampão de digestão NDB (250 mM sacarose, 50 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,05 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 15 mM Tris-HCl pH 7,5), agitado por turbilhamento por 1 min na velocidade 8 rpm, em seguida foi adicionado 400 µL de fenol-clorofórmio (1:1) homogeneizado por inversão, centrifugado por 5 min a 13.400 rpm, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 350 µL de fenol-clorofórmio (1:1), homogeneizado por inversão, centrifugado por 5 min a 13.400 rpm, foi novamente transferido o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 300 µL de clorofórmio, homogeneizado por inversão, centrifugado por 5 min a 13.400 rpm, coletado novamente o sobrenadante e transferido para um novo tubo de 1,5 mL, adicionado 12,5 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 com 225 µL de etanol 100%, homogeneizado por inversão, centrifugado por 15 min a 13.400 rpm, nessa etapa foi descartado o sobrenadante e o DNA foi lavado adicionando 1 ml de EtoH 70%, homogeneizado por inversão, centrifugado

por 15 min a 13.400 rpm, descartado novamente o sobrenadante e ressuspensão em 100 µL de Tris-HCl 5 mM pH 7,5 (GONZALEZ; SCAZZOCCHIO, 1997 com adaptações).

Ao final do processo de extração do DNA o material foi analisado em gel de agarose na concentração de 1,2 %, para então visualizar a qualidade da extração, evidenciando ou não degradações no DNA. Verificada a qualidade do mesmo, o DNA dos dois fungos foi quantificado utilizando-se o equipamento *Qubit Fluorometer* (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante.

2.5 Identificação molecular fúngica

A identificação molecular dos fungos foi realizada pela amplificação da região intergênica transcrita (ITS). Foi realizado a PCR com iniciadores específicos, chamados iniciador direto ITS1 5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A3' (GARDES *et al.*, 1993), iniciador reverso ITS4 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3' (WHITE *et al.*, 1990). O volume final da PCR foi de 25 µL sendo preparado com 2,5 µL de tampão *Taq* polimerase 1X, 0,6 µL da enzima *Taq* polimerase (3 U/µL), 2 µL de dNTP (0,2 nM), 2,5 µL do iniciador ITS1 (25 pmol), 2,5 µL do iniciador ITS4 (25 pmol), 1 µL de DNA e 13,9 µL de água miliQ, *Aspergillus terreus* ATCC 20542 foi usado como controle positivo e como controle negativo foi usado água *milli-Q* (SMIT *et al.*, 1999).

As amostras foram colocadas em termociclador, sob programa de amplificação com desnaturação inicial de 10 min a 95 °C. Seguido de repetição de 40 ciclos com permanência de 1 min a 94 °C para a desnaturação, 1 min a 55 °C para hibridação dos iniciadores e 2 min a 72 °C para extensão. Para a extensão final do DNA, a temperatura foi mantida a 72 °C por 10 min e, para manter as amostras conservadas até o momento da estocagem, foi programado um período de 4 °C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 0,9 % (SMIT *et al.*, 1999).

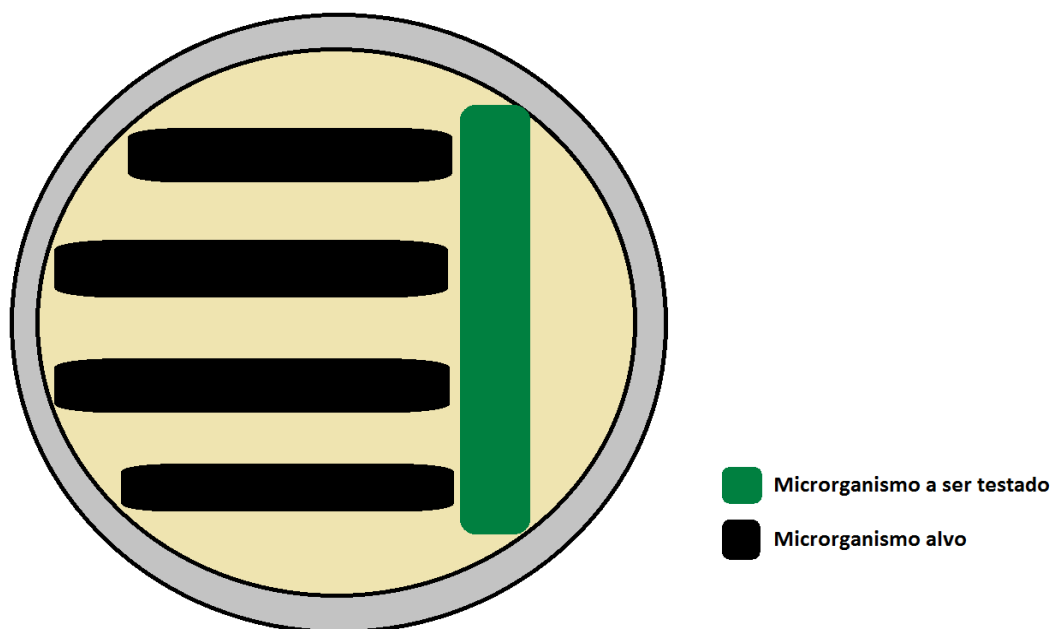
Os produtos de amplificação foram purificados pelo kit (*Cycle pure kit*, E.Z.N.A) em mini-colunas (*Hibind DNA mini colum*), e sequenciados em sequenciador automático (Applied Biosystems, Hitachi). Para as reações de sequenciamento foi utilizado o *kit Big Dye terminator V3.1 kit for Applied Biosystems* (Hitachi). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa DNA-Dragon (*Dna Sequence*

Contig Assembler Software, SequentiX – Digital Processing), e comparadas com as sequências de genes de microrganismos representados na base de dados do Genbank (www.ncbi.nlm.gov/Genbank). Nos casos em que a identificação molecular não apresentou resultados consistentes, esta foi complementada com os dados da taxonomia convencional (Altschul et al., 1997 com adaptações).

2.6 Avaliação de antibiose em placa

Após o isolamento dos fungos, foi realizado um teste de triagem, denominado teste de antibiose em placa, para avaliar se esses possuíam alguma atividade antimicrobiana. Para o respectivo teste foi utilizado o método de antibiose em traço cruzado (Figura 3), no qual se inocula o microrganismo a ser testado em um traço vertical de uma placa de Petri e os microrganismos alvo em traços perpendiculares a este traço vertical.

Figura 3. Representação esquemática do teste de antibiose em placa.



Os fungos foram inoculados na forma de um traço vertical em ágar BDA, em seguida incubou-se por 7 dias em estufa bacteriológica a 27 ± 2 °C para que atingissem sua fase estacionária de crescimento. Então inoculou-se os microrganismos alvo em traço perpendicular previamente crescidos em caldo *Brain*

Heart Infusion (BHI) (infusão de cérebro de bezerro 200 g.L⁻¹, infusão de coração de boi 250 g.L⁻¹, peptona protease 10 g.L⁻¹, glicose 2 g.L⁻¹, cloreto de sódio 5 g.L⁻¹ e fosfato dissódico 2,50 g.L⁻¹) por aproximadamente 24 h a 37 °C. Foram utilizadas para o teste de triagem bactérias de grande interesse clínico. Para o grupo das bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* ATCC 8739; perfazendo um total de 4 microrganismos testados. Esses microrganismos alvo foram inoculados desde a extremidade da placa até 0,3 mm de distância do crescimento fúngico. Por fim, a placa foi colocada na estufa a 37 °C por 24 h, no caso de haver inibição, mediu-se a distância entre o microrganismo alvo e o fungo com uma régua milimetrada (HECK, 2007 com adaptações).

2.7 Obtenção dos filtrados

Para realização dos testes de atividade antimicrobiana foi necessária a obtenção dos filtrados após o crescimento fúngico em meio líquido.

Na obtenção dos filtrados, primeiramente foi retirado com uma ponteira com diâmetro de 8 mm, três fragmentos circulares de cada colônia previamente crescida em ágar BDA a 27 °C por 7 dias, os fragmentos correspondentes ao fungo 1 e fungo 2 foram colocados separadamente para crescimento em dois frascos contendo 200 mL de caldo BHI cada um. Nos primeiros 7 dias a cultura foi incubada em estufa bacteriológica a 27 °C sem agitação, após esse período os frascos foram colocados em agitação orbital a 300 rpm por mais 7 dias, totalizando 14 dias de cultura.

Os cultivos foram colocados em tubos de 15 mL e centrifugados por 5 min a 11.000 rpm, com a finalidade de separar a parte celular da parte líquida. Após essa separação os sobrenadantes foram coletados, e submetidos a filtração em membrana *Milipore* de 0,22 µm, para remover possíveis contaminantes. Obteve-se por fim 2 filtrados, um referente ao crescimento do fungo 1, que foi denominado de filtrado 1, e o outro referente ao crescimento do fungo 2, denominado de filtrado 2.

Para controle da esterilidade dos filtrados, foi inoculado 1 mL de cada filtrado em placas separadas contendo ágar tripticase de soja acrescido com 5% de sangue

de carneiro e incubado a 37 °C a 24 h. Por fim, foi avaliado se houve crescimento de algum contaminante bacteriano ou fúngico.

Após a confirmação da esterilidade, evidenciado pelo não crescimento de contaminantes, os filtrados foram liofilizados, redissolvidos em água miliQ, obtendo por fim uma concentração final (de 556 mg.mL⁻¹ para o extrato 1 e 578 mg.mL⁻¹ para o extrato 2), sendo por fim liberados para os testes de bioensaio.

2.8 Ensaio antimicrobiano por microdiluição

As suscetibilidades de microrganismos aos filtrados 1 e 2 foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo recomendado pelo “*US National Committee for Clinical Laboratory Standards*” (NCCLS), com adaptações. Foram testados 4 microrganismos, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* ATCC 8739, os microrganismos testados foram cultivados em ágar Müeller-Hinton (MH) (infusão de bife e coração 2.00 g.L⁻¹, caseína ácida hidrolisada 17.50 g.L⁻¹, amido 1.50 g.L⁻¹, agar 17.00 g.L⁻¹) a 37 °C por 24 h. A partir desses cultivos foram preparadas suspensões celulares semelhantes a escala 0,5 de MacFarland, que é compatível com 1.0 x 10⁸ UFC/ml, essa suspensão foi diluída na escala (1:100) em meio BHI com a finalidade de obter uma concentração final bacteriana de 1.0 x 10⁶ UFC.ml⁻¹.

O bioensaio foi realizado em placa de 96 poços com 100 µl da suspensão bacteriana previamente preparada em BHI e 50 µl de cada extrato, seguido por incubação em leitor de microplaca a 37 °C por 16 h. Foram testadas apenas 2 concentrações dos extratos, a concentração de 556 mg.ml⁻¹ e 278 mg.ml⁻¹ para o filtrado 1, 578 mg.ml⁻¹ e 289 mg.ml⁻¹ para o filtrado 2, as diluições sempre foram preparadas no mesmo meio de cultura (BHI). Foi usado como controle positivo 50 µl de cloranfenicol (30 µg.ml⁻¹) acrescido de 100 µl da suspensão de 1.0 x 10⁶ UFC.ml⁻¹, já para o controle negativo foi utilizado 100 µl da suspensão de 1.0 x 10⁶ UFC.ml⁻¹ previamente preparada em caldo BHI, acrescida de 50 µl de BHI. A leitura das absorbâncias foram pontuais de 30 em 30 min automaticamente pelo leitor de microplacas (PowerWave, BioTek), após o resultado final os valores referentes à leitura 0 h, 12 h e 16 h, foram calculadas as percentagens de inibição de cada bactéria contra cada diluição e inseridas em uma tabela de 0 a 100%.

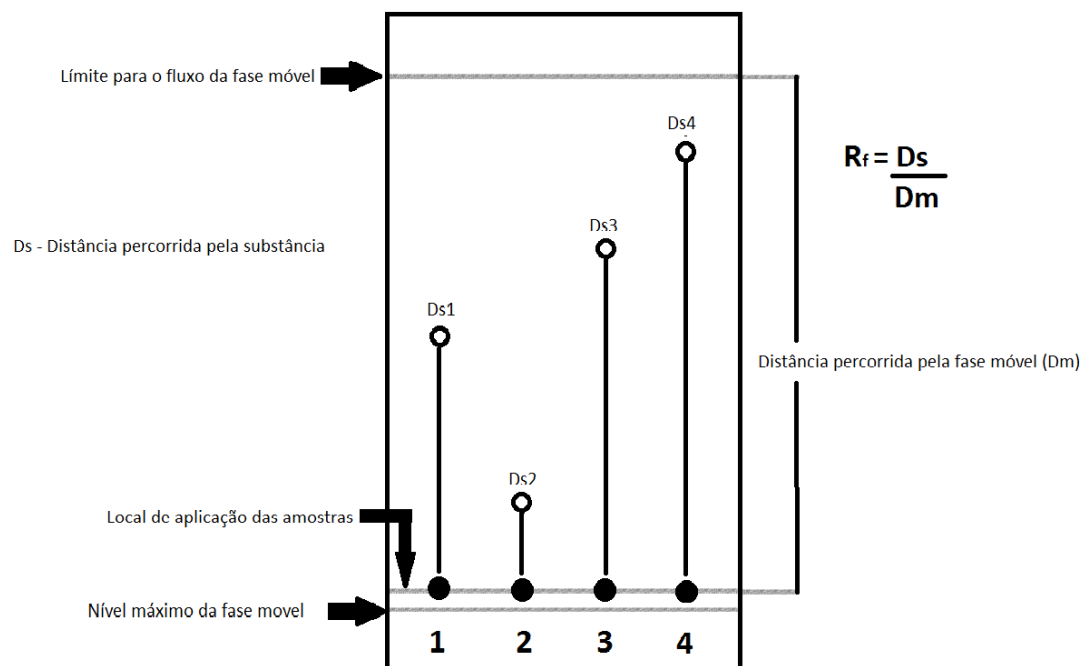
2.9 Avaliação do perfil químico dos filtrados

Com a finalidade de diferenciar os possíveis compostos presentes no filtrado 1 e 2, foram realizadas avaliações por meio de métodos cromatográficos e por espectrometria de massas.

A triagem dos compostos foi realizada em cromatografia por camada delgada (CDD) (Figura 3) tendo como suporte (fase estacionária) placas cromatográficas do tipo (Merck 60 GF 254 compostas de sílica gel), pré-moldadas com comprimento de 10 cm e largura de 5 cm. Foram aplicados 4 poços em cada placa, contendo no primeiro poço 2 μ L de L-triptofano servindo como aminoácido padrão, no segundo 2 μ L do meio de cultura puro (BHI), no terceiro 2 μ L do filtrado 1 e no quarto poço 2 μ L do filtrado 2, sendo aplicados com distância de 1 cm da base e 1 cm de espaço das demais amostras. As placas foram secas a temperatura ambiente e em seguida colocadas em uma cuba de vidro contendo a fase estacionária composta de isopropanol/ácido acético/água (75:30:15), no qual esperou-se a migração do solvente até alcançar a marca de 9 cm. As placas então foram retiradas da cuba e em seguida secas novamente a temperatura ambiente. Para cada placa foi aplicado um revelador diferente, os reveladores foram aplicados com o auxílio de um borrifador e secos logo em seguida com secador de cabelo. Para revelação dos compostos foi utilizada ninhidrina para aminoácidos e aminas primárias, dragendorff para aminas secundárias e alcalóides, Vanilina sulfúrica para terpenos e derivados policetídeos e lâmpada UV de 365 nm para compostos aromáticos principalmente flavonóides. Após a revelação das placas foi medida a distância percorrida por cada composto com o auxílio de uma régua milimetrada de 30 cm e, posteriormente calculado o fator de retenção (R_f) de cada composto (COLLINS, 1993; WAGNER; BLADT, 1996).

A inspeção das massas moleculares (MS) presentes nos filtrados foram realizadas por espectrômetro de massas do tipo MALDI TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Alemanha), operando no modo refletivo positivo. As frações foram dissolvidas em uma matriz saturada de ácido α -cyano 4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila, água e ácido trifluoroacético (2,5:2:0,5).

Figura 4. Representação esquemática cromatograma obtido por CDD.

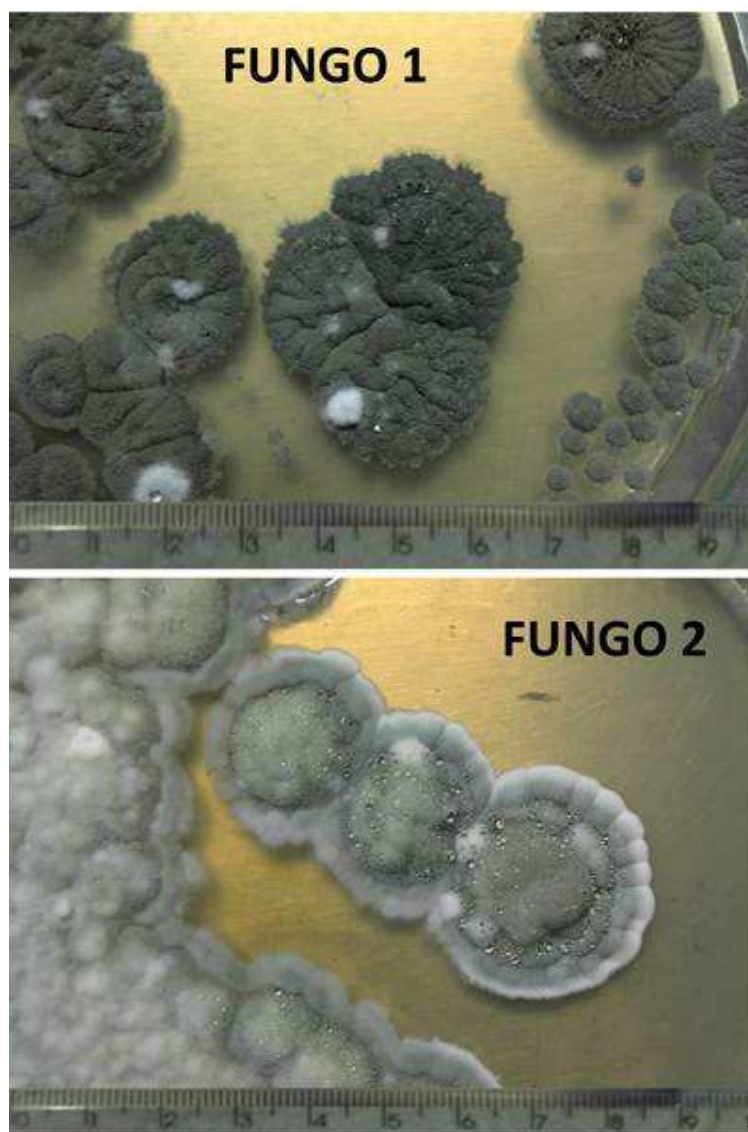


3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e caracterização das linhagens fúngicas

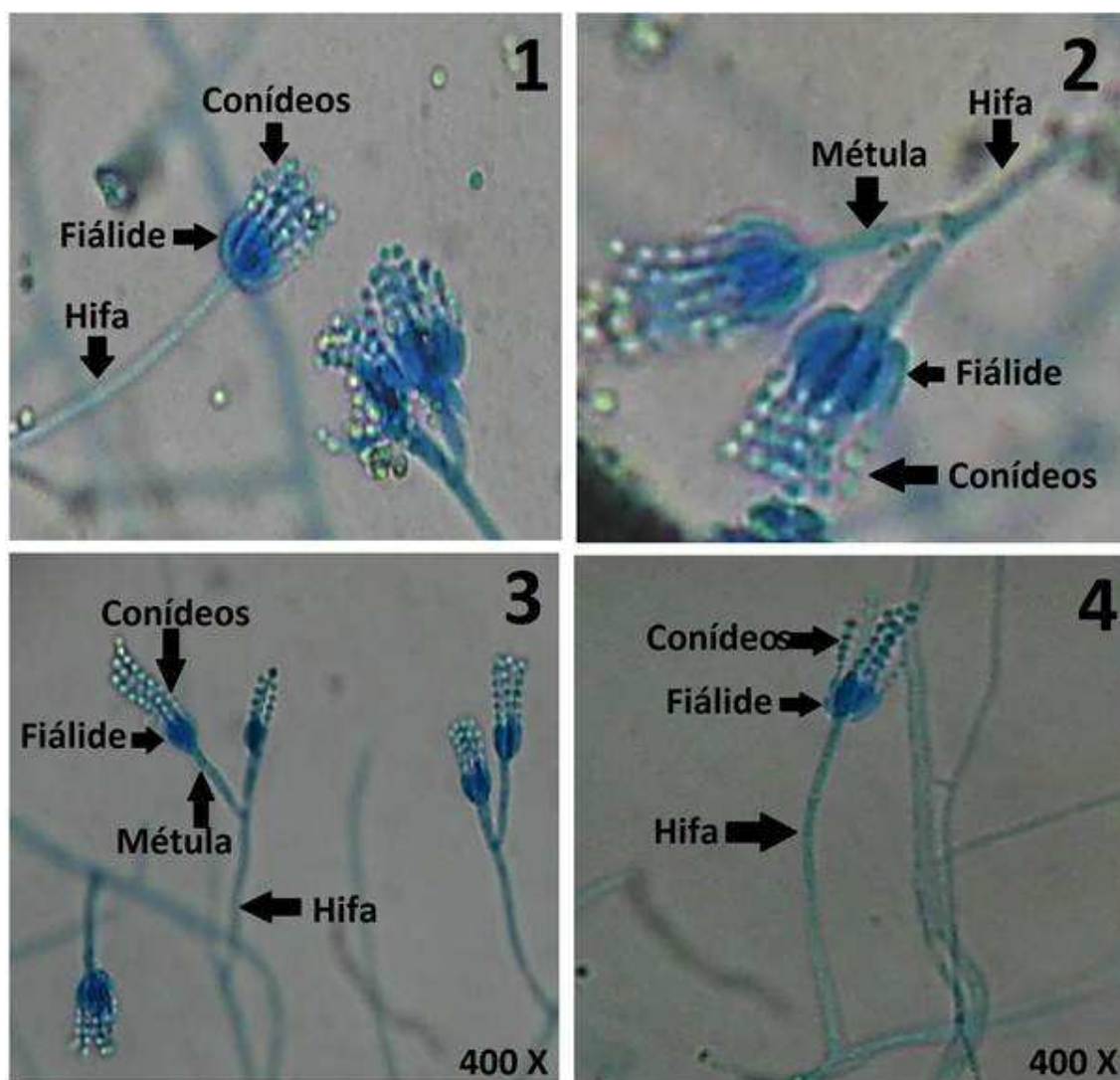
A partir da fração coletada em solo, foram isolados 2 fungos, sendo esses fotografados separadamente, com a finalidade de registrar o aspecto macroscópico de cada colônia (Figura 5).

Figura 5. Aspecto macroscópico do fungo 1 e 2, após cultivo do material preparado da fração do solo por 7 dias a 27 ± 2 °C em ágar BDA.



Após a avaliação do aspecto macroscópico dos fungos, ambos foram cultivados em microcultivos para visualização do aspecto microscópico (Figura 6).

Figura 6. Análise de microscopia de luz, 1) e 2) fungo 1, 3) e 4) fungo 2, e respectivas estruturas microscópicas após crescimento realizado em microcultivo por 7 dias a 27 ⁺. 2 °C em ágar BDA. Foto adquirida através do microscópio biológico trinocular modelo E-200 (Nikon).



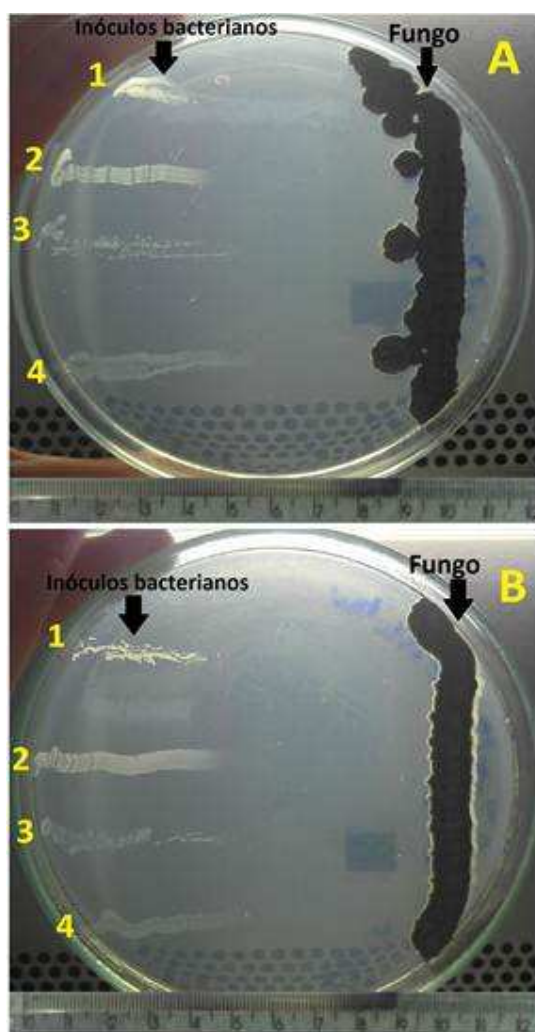
Após avaliação macro e micromorfológica, os dois fungos foram caracterizados como pertencentes ao gênero *Penicillium* sp., pois apresentaram na micromorfologia estruturas características do gênero, hifas hialinas septadas, conidióforos em alguns momentos simples e em outros ramificados, fiálides em forma de garra, conídios esféricos formados a partir da extremidade no conídio previamente formado (SIDRIM; ROCHA, 2004; KONEMAN *et al.*, 2008). A classificação da espécie não

pode ser feita apenas pela avaliação micro e macroscópica, devida à grande diversidade presente no gênero *Penicillium* sp. e por apresentarem características muito próximas entre as espécies, sendo então necessário o uso de técnicas moleculares para esse tipo de classificação.

3.2 Triagem em placa

A triagem em placa foi realizada com os 2 isolados fúngicos na qual evidenciou-se atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas (Figura 7).

Figura 7. Avaliação de antibiose em placa realizado em ágar BDA por 24 h a 37 °C, após crescimento fúngico por 7 dias a 28 °C, a) fungo 1, b) fungo 2, e respectivos microrganismos alvos: 1) *S. aureus* ATCC 25923, 2) *E. faecalis* ATCC 29212, 3) *K. pneumoniae* ATCC 13883 e 4) *E. coli* ATCC 8730.



A distância de inibição foi verificada entre todos os microrganismos testados, e suas medidas foram registradas (Tabela 2).

Tabela 2. Distância de inibição dos fungos 1 e 2 frente a quatro bactérias testadas.

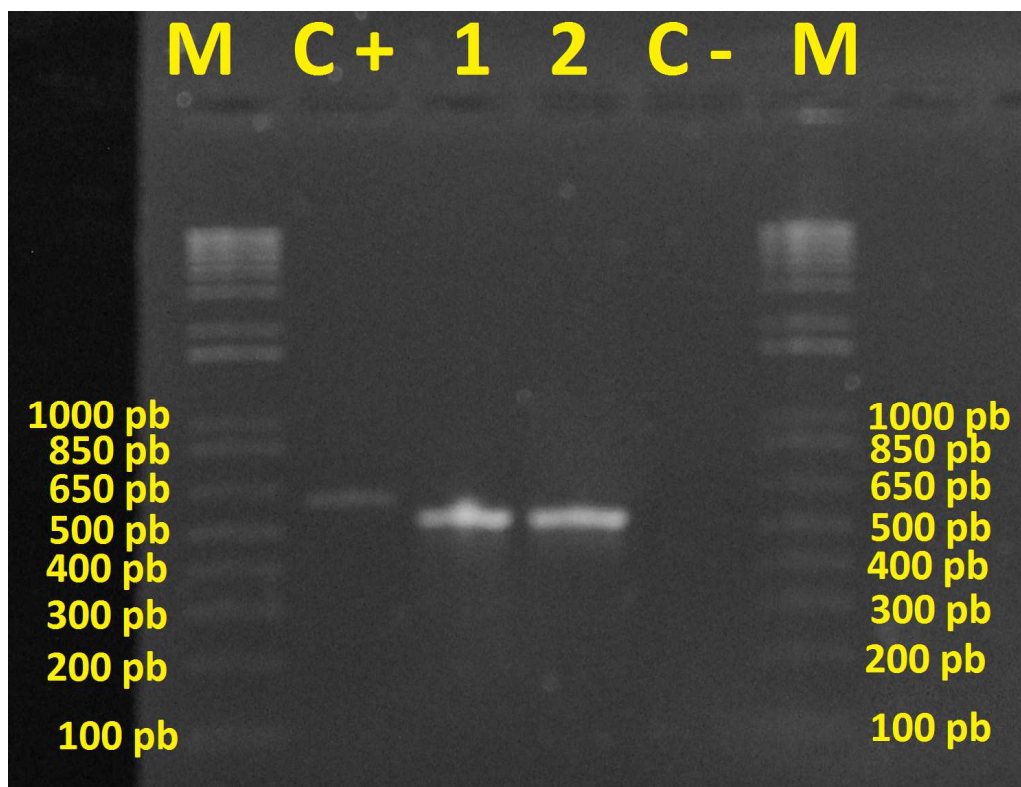
Microrganismos alvos	Distância de inibição	Distância de inibição
	Fungo 1	Fungo 2
<i>S. aureus</i>	3,9 cm	5,6 cm
<i>E. faecalis</i>	4,1 cm	4,8 cm
<i>K. pneumoniae</i>	3,6 cm	4,5 cm
<i>E. coli</i>	3,4 cm	4,0 cm

Os resultados obtidos pela metodologia de triagem em placa sugerem uma maior capacidade de inibição contra bactérias Gram positivas, *S. aureus*, *E. faecalis*. Porém, no teste preliminar também foi demonstrada atividade contra bactérias Gram negativas. Estudo anterior relatado por Josy *et al.* (2010) realizado com 60 estirpes de *Penicillium*, demonstraram uma maior capacidade de inibição em bactérias Gram positivas. Porém, também foi evidenciado em algumas espécies como *P. decumbens*, *P. montanenses*, *P. paxillii*, *P. rugulosum* a capacidade de inibir bactérias Gram negativas, como foi observado no teste de antibiose em placa realizado em nosso trabalho.

3.3 Caracterização das espécies por método molecular

A classificação das espécies foi realizada a partir da amplificação da região intergênica transcrita (ITS), na qual foi amplificada uma região do DNA ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2). Para isto, foi utilizado como controle positivo o fungo *Aspergillus terreus* ATCC 20542 e como controle negativo água, revelando uma banda de 580 pb para o *A. terreus*, uma banda de 525 pb para os fungos 1 e 2. Para o controle negativo não foi evidenciada nenhuma banda (Figura 8).

Figura 8. Gel de agarose 0,9% do produto da amplificação da região ITS. As letras indicam: M) marcador molecular; C+) controle positivo *A. terreus*; 1) fungo 1; 2) fungo 2; e C-) controle negativo.



As seqüências obtidas do produto da PCR foram analisadas pelo programa (BLAST) inseridas no GenBank, sediado no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), nos quais ambos foram identificados como *Penicillium citrinum* e tiveram 100% de identidade frente a 37 seqüências, já depositadas no banco de dados, de *P. citrinum*. Tais resultados corroboraram os trabalhos de CÓRDOBA *et al.* (2002) e MENEZES *et al.* (2010) nos quais métodos moleculares utilizando a análise do DNA permitiram diferenciar espécies, uma vez que, marcadores moleculares são capazes de detectar o polimorfismo existente entre as seqüências de nucleotídeos dos organismos.

A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que ambos os fungos selecionados pertencem ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, gênero *Penicillium* e espécie *Penicillium citrinum* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Fungos do gênero *Penicillium* apesar de serem historicamente os mais investigados quanto ao seu metabolismo secundário, ainda são considerados promissores para fornecer moléculas inéditas e bioativas (BRINGMANN *et al.*, 2004; DE SILVA *et al.*, 2004; SASAKI *et al.*, 2005; PROKSCH *et al.*, 2008).

Estudo realizado por Ranic *et al.* (2006) reportaram que existe um grande número de extratos de fungos e/ou produtos extracelulares com atividade antimicrobiana, especialmente de espécies de *Penicillium* sp. Entre outros, *P. breviocompactum*, *P. carneus*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. dipodomyis*, *P. flavigenum*, *P. funiculosum*, *P. griseofulvum*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum* e *P. persicinum* são espécies relatadas como produtoras de antibióticos, especialmente de penicilina e griseofulvina.

3.4 Teste da atividade antimicrobiana em microdiluição

A atividade antimicrobiana testada pela metodologia de microdiluição em caldo evidenciou a capacidade de inibir em até 100% todas as bactérias testadas, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* ATCC 8730. O ensaio no qual se obteve maior capacidade de inibição frente as bactérias alvos foi com a concentração de 578 mg.mL⁻¹ obtido após fermentação em estado líquido do fungo 2 que, por sua vez, recebeu o nome de filtrado 2.

Os resultados obtidos e suas respectivas porcentagens de inibição estão descritas nas figuras 9 e 10.

Figura 9. Resultado do teste de microdiluição do filtrado 1 com as concentrações: (a) 278 mg.mL^{-1} e (b) 556 mg.mL^{-1} realizado em caldo BHI por 16 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em leitor de microplaca (PowerWave, BioTek). O símbolo σ indica o desvio padrão. Foi usado como controle positivo o antibiótico cloranfenicol na concentração de $30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o meio de cultura BHI estéril como controle negativo

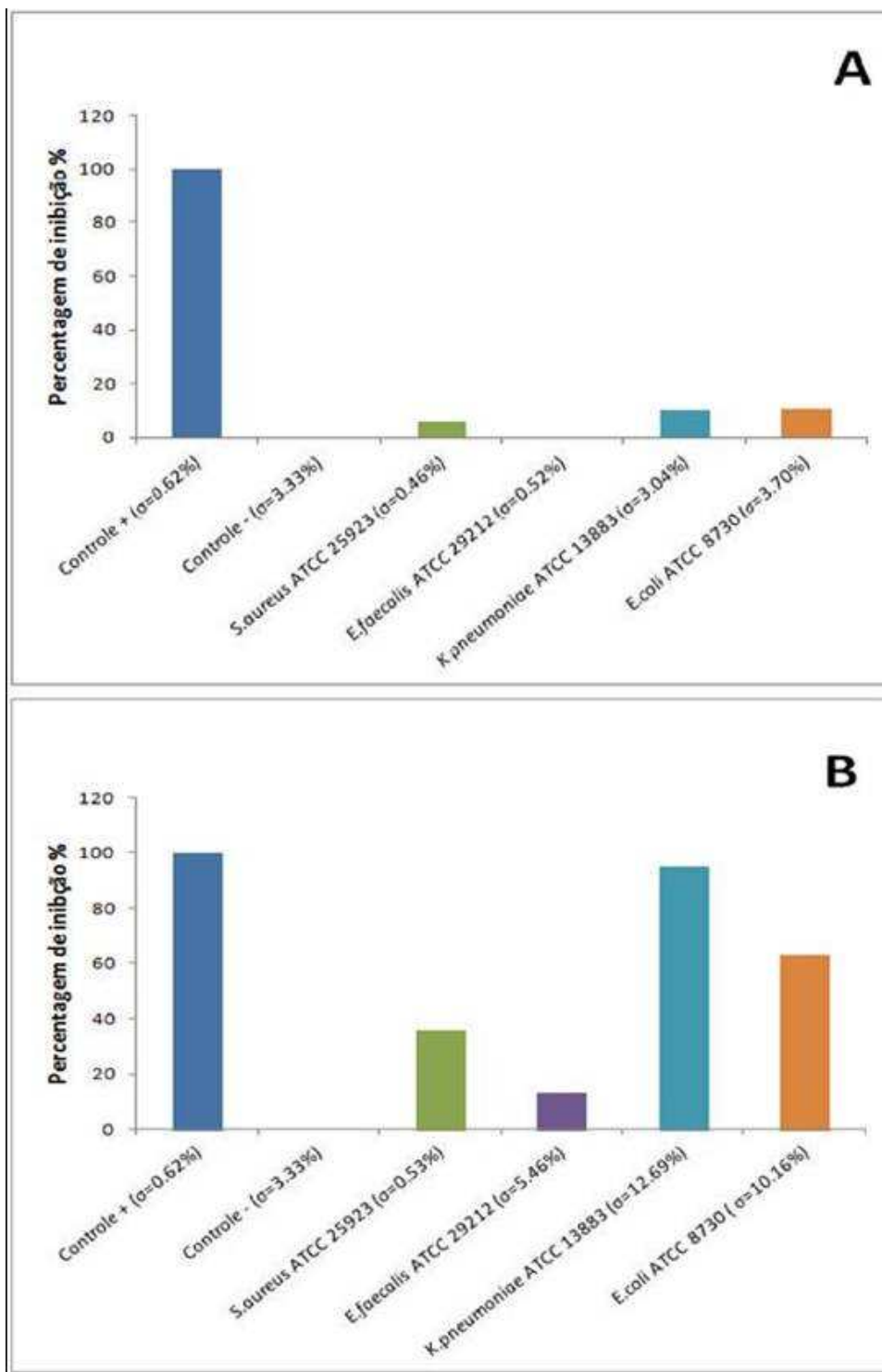
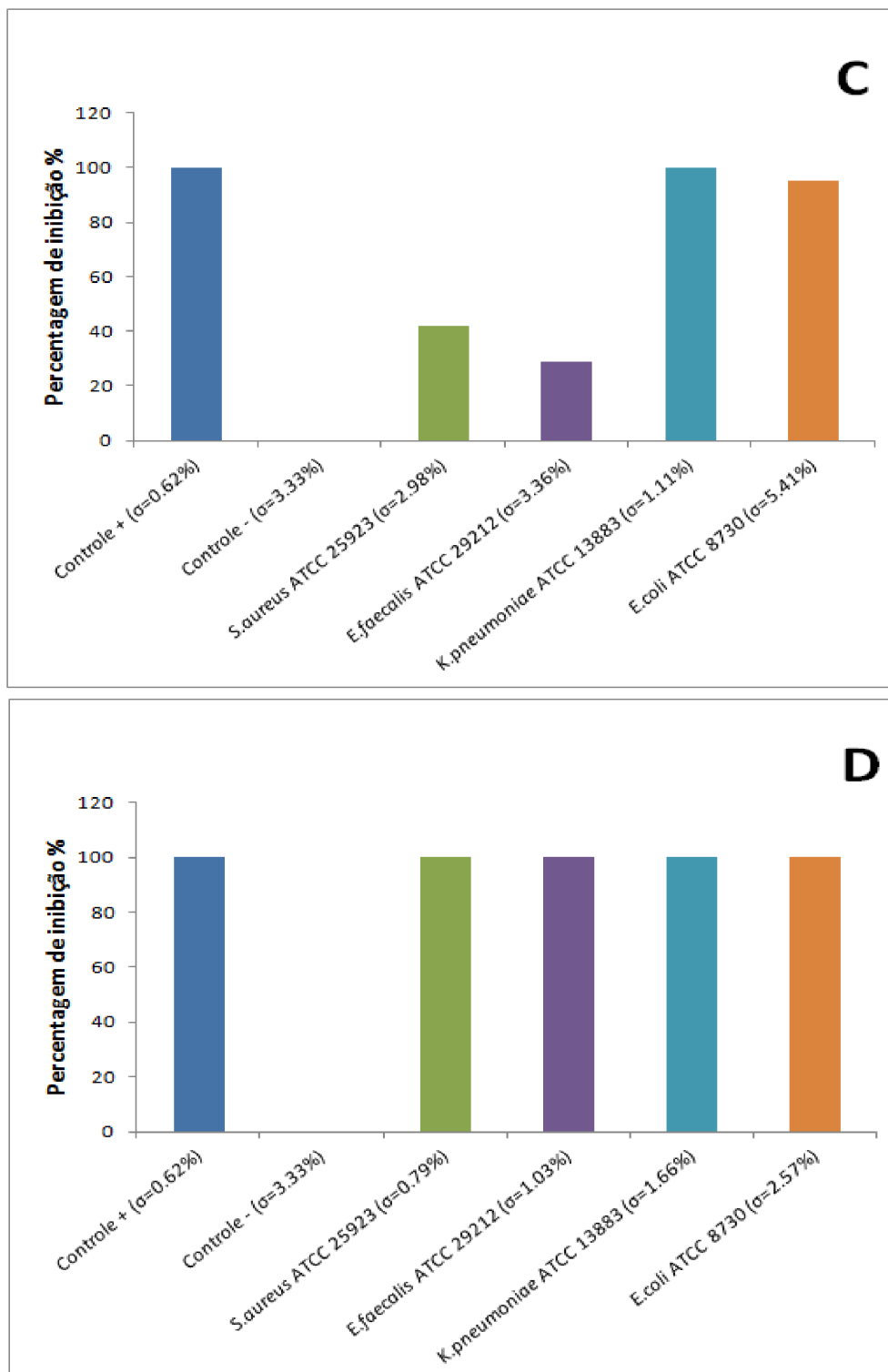


Figura 10. Resultado do teste de microdiluição do filtrado 2 com as concentrações: (a) 289 mg.mL^{-1} e (b) 578 mg.mL^{-1} realizado em caldo BHI por 16 h a 37°C em leitor de microplaca (PowerWave, BioTek). O símbolo σ indica o desvio padrão. Foi usado como controle positivo, cloranfenicol na concentração de $30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o meio de cultura BHI estéril como controle negativo.



Os resultados obtidos sugerem que *P. citrinum* do qual se obteve o filtrado 2 possui uma maior capacidade de produção de metabólito, ou metabólitos com potencial antimicrobiano, e seu espectro de ação tem uma maior efetividade contra bactérias Gram negativas. Em um estudo realizado por PASTRE *et al.* (2007) os autores relataram um metabólito secundário da classe dos policetídeos produzido por *Penicillium* denominado citrinina H-1, com alta atividade bactericida quando testada frente às bactérias Gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*, metabólito esse isolado do fungo *P. herquei*.

LUCAS *et al.* (2007) evidenciaram atividade antimicrobiana do metabólito secundário esclerotiorina produzido por *P. sclerotiorum* contra as bactérias Gram positivas *S. aureus* e *S. pyogenes* e Gram negativas *S. typhimurium* e *E. coli* contra a levedura *C. albicans*.

A revisão na literatura relata que alguns compostos produzidos por *P. citrinum* com atividade antibiótica, como penicitrinol B e penicitrinone C possuem atividade antioxidante (LU *et al.*, 2008), penicitrinol C e E possuem atividade citotóxica contra células leucêmicas da linhagem HL-60 (CHEN *et al.*, 2011), isocyclocitrinol A e 22-acetylisocyclocitrinol A possuem atividade antibacteriana contra *S. epidermidis* e *E. durans* (AMAGATA *et al.*, 2003).

Apesar da identificação final dos fungos 1 e 2 serem a mesma, *P. citrinum* foi evidenciada uma maior capacidade antibacteriana no extrato 2 quando comparado ao extrato 1. No estudo realizado por OKAMI; HOTTA (1988), evidenciaram que existem estirpes de uma mesma espécie de actinobactérias que produzem antibióticos diferentes, e estirpes de espécies diferentes que produzem o mesmo antibiótico. Em suma, a produção de antibióticos pode ser estirpe-específica e não espécie específica, conforme descrito por PADILHA (1998). Além disso, estas discrepâncias também podem ser explicadas pela variabilidade genética em nível intraespecífico (SUAY *et al.*, 2000).

3.5 Análise química dos filtrados

O perfil químico dos filtrados 1 e 2 avaliados pela metodologia de cromatografia em camada delgada, foi útil na detecção de alguns compostos presentes nos

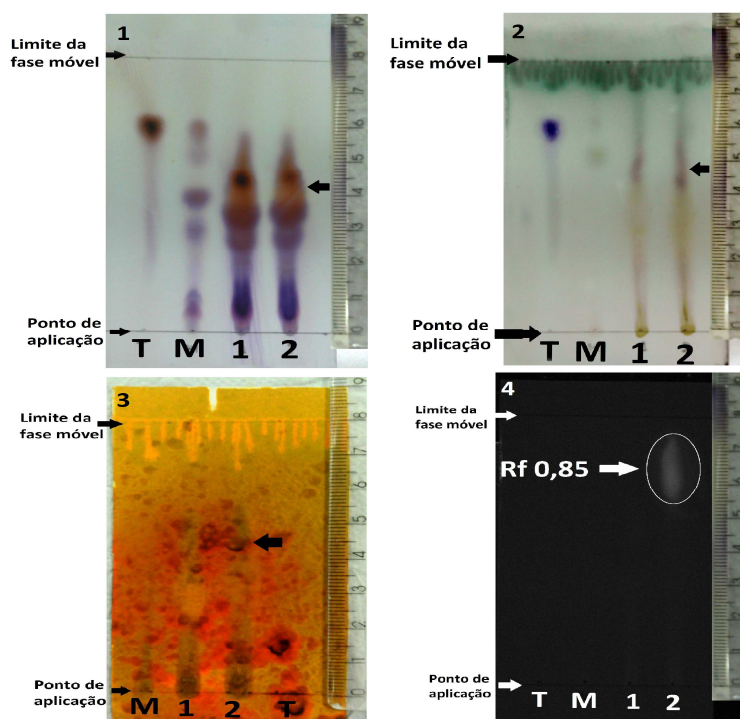
filtrados, a metodologia foi realizada com a finalidade de direcionar a melhor metodologia para isolamento do composto de interesse.

Ambos os filtrados apresentaram cromatogramas muito semelhantes, quando revelados com os diferentes reativos reveladores ninhidrina, draggendorff, vanilina sulfúrica. Contudo, quando revelados com lâmpada UV de 365 nm o filtrado 2 apresentou a revelação de um composto diferente com Rf aproximado de 0,85.

A análise inicial permitiu identificar a presença de amins primárias, alcalóides, policetídeos em ambos os filtrados, sendo a única diferença química revelada com os reativos testados a presença de compostos fenólicos no filtrado 2.

Fotos dos testes de coloração com ninhidrina, draggendorff, vanilina sulfúrica e com lâmpada UV estão descritas na Figura 11.

Figura 11. Análise química de filtrados obtidos por dois isolados de fungos. Em 1) coloração com ninhidrina, revelando uma intensa produção de compostos derivados de prolina que são representados no teste pela cor amarela; 2) Coloração com vanilina sulfúrica revelando prováveis policetídeos, apresentados no teste com uma coloração rosa arroxeada; 3) Coloração com draggendorff, no qual pode ser evidenciado possível composto derivado de amins secundárias, ou alcaloides; 4) Resultado da revelação com lâmpada UV 365 nm, no qual pode ser evidenciado um composto aromático, possível composto fenólico. Todos os compostos citados não aparecem no meio de cultura (controle negativo) e estão indicados pelas setas centrais. As letras indicam: T) L-triptofano; M) meio de cultura BHI; 1) filtrado 1 e 2) filtrado 2.



3.6 Análise de massas (MS) por espectrometria do tipo MALDI TOF/TOF.

O espectro de massas do filtrado 1 apresentou as seguintes massas moleculares (m/z): 353 Da, 388 Da, 404 Da, 410 Da, 442 Da, 454 Da, 459 Da, 476 Da, 650 Da, 861 Da, 877 Da e 893 Da. Sendo que dessas 12 massas adquiridas, 6 não possuem referências na literatura de que são produzidas por fungos do gênero *Penicillium*, sendo elas: 410 Da, 459 Da, 650 Da, 861 Da, 877 Da e 893 Da.

Espectro de massas do filtrado 2 apresentaram as seguintes massas moleculares (m/z): 353 Da, 404 Da, 410 Da, 416 Da, 420 Da, 441 Da, 442 Da, 527 Da, 528 Da, 552 Da, 571 Da, 861 Da, e 877 Da. Sendo que dessas 13 massas adquiridas 7 não possuem referências na literatura de que são produzidas por fungos do gênero *Penicillium* sp., sendo elas: 410 Da, 420 Da, 441 Da, 527 Da, 552 Da, 861 Da e 877 Da.

Compostos que possuem referência de que são produzidos por fungos do gênero *Penicillium* sp. e que apresentam massas moleculares iguais as encontradas em nosso extratos foram listados na Tabela 3.

Tabela 3. Compostos produzidos por fungos do gênero *Penicillium* sp. que possuem correlação entre as massas encontradas na análise por espectrometria de massas dos filtrados de *P. citrinum* isolados neste trabalho, e respectivos *P.* produtores. A comparação de massas foi realizada pelo banco de massas KNApSACK (http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/top.html).

Massa molecular	Composto Provável	<i>Penicillium</i> produtor	Referência
353 Da	BREVICOMPANINE C	<i>P. brevicompactum</i>	KIMURA <i>et al.</i> , (2005).
388 Da	3-O-METHYLFUNICONE	<i>P. pinophilum</i>	NICOLETTI <i>et al.</i> , (2009).
388 Da	SERANTRYPINONE	<i>P. thymicola</i>	ROMERO <i>et al.</i> , (2001).
388 Da	SCULEZONONE A	<i>Penicillium</i> sp.	KOMATSU <i>et al.</i> , (2000).
404 Da	SCULEZONONE B	<i>Penicillium</i> sp.	KOMATSU <i>et al.</i> , (2000).
416 Da	ISOCHROMOPHILONE I	<i>Penicillium</i> sp. FO-2338	OMURA <i>et al.</i> , (1993).
442 Da	PAXISTEROL	<i>P. paxili</i> KAC 1843	NAKANO <i>et al.</i> , (1988)
442 Da	ANTIBIÓTICO RP 1551-3	<i>Penicillium</i> sp. SPC-21609	TOKI <i>et al.</i> , (1999).
442 Da	COMUNESIN E	<i>P. expansum</i> MK-57	JADULCO <i>et al.</i> , (2004).
454 Da	ARISUGACIN E	<i>Penicillium</i> sp. FO-4259-11	OTOGURO <i>et al.</i> , (2000).
476 Da	XANTHOVIRIDICATIN D	<i>P. viridicatum</i>	MEDENTSEV; AKIMENKO, (1998).
528 Da	ARISUGACIN H	<i>Penicillium</i> sp. FO-4259-11	OTOGURO <i>et al.</i> , (2000).
528 Da	F 13459	<i>Penicillium</i> sp. F13459	MUROI <i>et al.</i> , (2001).
528 Da	RUBROSULPHIN	<i>P. viridicatum</i>	MEDENTSEV; AKIMENKO, (1998).

Das 12 massas que possuem referências na bibliografia, nenhuma foi descrita em *Penicillium citrinum*, confirmando a descrição de OKAMI; HOTTA (1988), que evidenciou espécies diferentes de microrganismos produzindo o mesmo composto.

Portanto, todas as massas evidenciadas a partir da análise por espectrometria de massas que não possuem referências na bibliografia e, até mesmo, as que possuem, são candidatas a terem atividade antimicrobiana pois, o meio em que foi realizado o cultivo dos fungos desse trabalho foi um meio incomum para o cultivo de fungos. E, segundo SUAY *et al.* (2000), alterações nas condições de cultivo micelial, tais como, o pH dos meios de cultivo, a disponibilidade de nutrientes, o tempo de incubação, a ausência ou presença de luz, as condições de aeração e agitação contribuem diretamente para a produção de metabólitos fúngicos. Porém, se torna necessário o devido isolamento do composto para poder então determinar qual a sua respectiva massa molecular.

4. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para isolamento de fungos com atividade antimicrobiana a partir do solo foi aplicada com sucesso, tendo em vista a obtenção de dois fungos com potencial antibacteriano.

A identificação dos fungos utilizando técnicas moleculares como a PCR mostrou-se adequada, principalmente com a utilização dos iniciadores universais ITS1 e ITS4 para a região intergênica do DNA ribossomal. Porém, a análise microscópica e macroscópica de cada fungo se torna imprescindível no direcionamento do gênero fúngico e para confirmar e complementar a identificação molecular.

A metodologia de antibiose em placa foi aplicada com facilidade e foi importante na detecção da possível atividade antibacteriana de cada fungo, pois a atividade evidenciada nesse teste foi confirmada por métodos mais sensíveis, como o método de microdiluição em caldo.

Ambos os fungos *P. citrinum* 1 e 2, apresentaram atividade antibacteriana quando testados seus extratos contra as bactérias *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *E. coli* confirmada pela inibição de até 100% das unidades formadoras de colônias (UFC), essa capacidade de inibição se torna bastante interessante existindo então a possibilidade em se descobrir um novo composto com atividade antibacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory Micology*, New York: John Wiley, 869, 1996.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFON, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs, *Nucleic Acids Research*, Bethesda, 73:3389-3402, 1997.

AMAGATA, T.; AMAGATA, A.; TENNEY, K.; VALERIOTE, F.A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; CREWS, P. Unusual C25 steroids produced by a sponge-derived *Penicillium citrinum*. *Organic Letters*, 13:4393-4396, 2003.

ARCHER, D.B.; CONNERTON, I.F.; MACKENZIE, D.A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 111:99-147, 2008.

BASTOS, V. Inovação farmacêutica: padrão setorial e perspectivas para o caso brasileiro, *BNDES Setorial*, 22:271-296, 2005.

BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 66:101-107, 1998.

BRINGMANN, G.; LANG, G.; STEFFENS, S.; SCHAUMANN, K. Petrosifungis A and B, novel cyclodepsipeptides from a sponge-derived strain of *Penicillium brevicompactum*, *Journal of Natural Products*, 67:312-315, 2004.

BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms, *Natural Products Reports*, 21:143-163, 2004.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

CÓRDOBA, A.S.; MENDONÇA, M.M; ARAÚJO, E.F. Avaliação da diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares em três estádios de estabilização de dunas, *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26:931-937, 2002.

DE SILVA, E.D.; GEIERMANN, A-S.; MITOVA, M. I.; KUEGLER, P.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.; MUNRO, M.H.G. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species, *Journal of Natural Products*, 72:477-479, 2009.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52:455-463, 1999.

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe, *Biotechnology Advances*, 18:499-514, 2000.

ECKERMAN, S.J; GRAHAN, K.J. Using chemical ecology to locate new antifungal natural products, In: Rahman, A. *Studies in Natural Products Chemistry*, 55-92, 2000.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma nova introdução a biologia, química e biotecnologia, *EDUCS*, Caixias do sul, 2004.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 3:12-16, 2000.

GARDES M, BRUNS T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993.

GONZALEZ, R.; SCAZZOCCHIO, C. A rapid method for chromatin structure analysis in the filamentous fungus *Aspergillus Nidulans*, *Nucleic Acids Research*, 25:3955-3956, 1997.

HECK, G. M. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S, *Dissertação (Mestrado)*, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

HORISAWA, S.; SAKUMA, Y.; DOI, S. Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi, *Journal of Wood Science*, 55:133-138, 2009.

JADULCO, R.; EDRADA, R.A.; EBEL, R.; BERG, A.; SCHAUMANN, K.; WRAY, V.; STEUBE, K.; PROKSCH, P. New communesin derivatives from the fungus *Penicillium* sp. derived from the Mediterranean sponge *Axinella verrucosa*, *Journal Nature*, 67:78-81, 2004.

JAY, J.M. Micotoxinas. In: *Microbiologia de alimentos 6ª edição*, Editora Artmed, Porto Alegre, 2005.

JIANG, Z.D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches, *Studies in Natural Products Chemistry*, 22:245-272, 2000.

JOSY, C. da S.; ORMEZINDA C.C.F.; MICHEL da S.M.; ARMANDO da C.R.JR.; MARIA, F.S.T. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia*, 2010.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism, from biochemistry to genomics. *Nature reviews, Microbiology*, 3:937-947, 2005.

KIMURA, Y.; SAWADA, A.; KURAMATA, M.; KUSANO, M.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T.; SHIMADA, A. Brevicompanine C, cyclo-(D-Ile-L-Trp), and cyclo-(D-Leu-L-Trp), plant growth regulators from *Penicillium brevicompactum*, *Journal Nature*, 68:237-239, 2005.

KOMATSU, K.; SHIGEMORI, H.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Sculezonones A and B, two metabolites possessing a phenalenone skeleton from a marine-derived fungus *Penicillium* species, *Journal Nature*, 63:408-409, 2000.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. *Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido 6ª edição*, Editora Guanabara Koogan, 2008.

LI, C.; WEI, L.; XIAO, H., KAI, H.; JIU-LIN, W.; WI-QING, Z. Citrinin Derivatives from the Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, 59:515-517, 2011.

LUCAS, E.M.F.; CASTRO, M.C.M.; TAKAHASHI, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. *Braz. Journal of Microbiology*, 38:785-789, 2007.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbial evolution, systematics and taxonomy, *Brock Biology of Microorganisms*, New Jersey: Prentice-Hall, 1986, 1997.

MARTÍN, J.F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intracellular communication, *Current Opinion in Microbiology*, 8:282-293, 2005.

MEDENTSEV, A.G.; AKIMENKO, V.K. Naphthoquinone metabolites of the fungi, *Phytochemistry*, 47:935-959, 1998.

MENEZES, J.P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONIL, C.G.; Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*, *Ciência e Tecnologia*, 34:132-139, 2010.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress obstacles and future trends, *Biotechnology Advances*, 26:177-185, 2008.

MICHAELSEN, A.; PINZARI, F.; RIPKA, K.; LUBITZ, W.; PINAR, G. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonizing paper material, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58:133-141, 2006.

MUROI, M.; SANO, K.; OKADA, G.; KOSHINO, H.; OKU, T.; TAKATSUKI, A. F13459, a new derivative of mycophenolic acid I. Taxonomy, isolation, and biological properties, *Journal of Antibiotics*, 54:489-493, 2001.

NAKANO, H.; HARA, M.; YAMASHITA, Y.; ANDO, K.; SHUTO, K. Paxisterol, a new analgesic sterol without anti-inflammation activity from *Penicillium*, *Journal of Antibiotics*, 41:409-410, 1988.

NICOLETTI, R.; MANZO, E.; CIAVATTA. Occurrence and bioactivities of funicone-related compounds, *International Journal of Molecular Sciences*, 10:1430-1444, 2009.

NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: NIGAM, P.S.; PANDEY, A. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer Science and Business Media, 2009.

NIJTEN, R.; LONDON, N.; VAN DEN BOGAARD, A.; STOBBERINGH, E. Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs, *The Veterinary quarterly*, 15:152-157, 1993.

OKAMI, Y.; HOTTA, K. Search and discovery of new antibiotic In: GOODFELLOW ST, WILLIAMS MM (eds), *Actinomycetes in Biotechnology*, London, 1:37-67, 1988.

OMURA, S.; TANAKA, H.; MATSUZAKI, K.; IKEDA, H.; MASUMA, R. Isochromophilones I and II, novel inhibitors against gp120-CD4 binding from *Penicillium* sp., *Journal of Antibiotics*, 46:1908-1911, 1993.

OTOGURO, K.; SHIOMI, K.; YAMAGUCHI.; ARAI, N.; SUNAZUKA, T.; MASUMA, R.; IWAI, Y.; OMURA, S. Arisugacins C and D, novel acetylcholinesterase inhibitors and their related novel metabolites produced by *Penicillium* sp., *Journal of Antibiotics*, 53:50-57, 2000.

PADILHA, G. Biologia molecular de Streptomyces e aplicações industriais *In*: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Ecologia Microbiana*, Jaguariúma, 13:327-350, 1998.

PASTRE, R.; MARINHO, M.R.A.; RODRIGUES-FILHO, E; SOUZA, Q.L.A.; PEREIRA, O.J. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*, *Química Nova*, 30:1867-1871, 2007.

PROKSCH, P.; EBEL, R.; EDRADA, R.; RIEBE, F.; LIU, H.; DIESEL, A.; BAYER, M.; LI, X.; LIN, W.H.; GREBENYUK, V.; MÜLLER, W.E.G.; DRAEGER, S.; ZUCCARO, A.; SCHULZ, B. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case, *Botanica Marina*, 51:209-218, 2008.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAN, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. *Advanced Biotech*, 19-25, 2008.

RANCIC, A.; SOKOVIC, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIC, J.; SKALTSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22:80-84, 2006.

ROMERO, A.M.; LARSEN, T.O.; PETERSEN, B.O.; DUUS, J.O.; CHRISTOPHERSEN, C.; BARRETO, A.F. A novel alkaloid serantrypinone and the spiro azaphilone daldinin D from *Penicillium thymicola*, *Journal Nature*, 64:1590-1592, 2001.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; VAN OORSCHOT, C.A.A. Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, *The Netherlands*, 1984.

SANTOS, C.; FRAGA, M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts, *Research in Microbiology*, 161:168-175, 2010a.

SANTOS, C.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Filamentous fungal characterizations by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Applied Microbiology*, 108:375-385, 2010.

SASAKI, M.; TSUDA, T.; SEKIGUCHI, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Perinadine A, a novel tetracycline alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*, *Organic Letters*, 7:4261-4264, 2005.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, M.G.; FURTADO, N.A.J.C.; PUPO, M.T.; FONSECA, M.J.V.; SAID, S.; SILVA, A.A.F.; BASTOS, T.K. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx, *Microbiological Research*, 159:317-322, 2004.

SOUZA, C.S. Uma guerra quase perdida. *Revista Ciência Hoje*, 23:27-35, 1998.
SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting, *Fungal Biology Reviews*, 23:9-19, 2009.

SUAY, F.; ARENAL, F.; ASENSIO, F.J.; BASILIO, A.; CABELLO, M.A.; DÍEZ, M.T.; GARCÍA, J.B.; DEL VAL, A.G.; GORROCHATEQUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; PELÁEZ, F.; VICENTE, M.F. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78:129-139, 2000.

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

TOKI, H.; TANAKA, T.; UOSAKI, Y.; YOSHIDA, M.; SUZUKI, Y.; KITA, K.; MIHARA, A.; ANDO, Y.; LOKKER, N.A.; GIESE, N.A.; MATSUDA, Y. RP-1551s, a family of azaphilones produced by *Penicillium* sp., inhibit the binding of PDGF to the extracellular domain of its receptor, *Journal of Antibiotics*, 52:235-244, 1999.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna, *Química Nova*, 29:326-337, 2006.

VINING, L.C. S. Secondary Metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes, *Weinheim: VHC*, 4:19-38, 1986.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e de vegetação espontânea, *Dissertação (mestrado)*, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas*, 2^a ed, Springer-Verlag, Berlin, 1996.

WAYNE, P.A. National Committee for Clinical Laboratory Standards; Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, *NCCLS Approved Standard M7-A4*, 1997.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications, *Academic Press*, New York, USA, 1990.

YU, J.H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 43:437-458, 2005.

ZHEN-YU, L.; ZHEN-JIAN, L.; WEN-LIANG, W.; LIN, D.; TIAN-JIAO, Z.; YU-CHUN, F.; QIAN-QUN, G.; WEI-MING, Z. Citrinin Dimers from the Halotolerant Fungus *Penicillium citrinum* B-57, *Journal Nature*, Qingdao, People's Republic of China, 2008.

Antimicrobial activity of metabolites of fungi isolated from soil.

KLÉBER DE SOUSA OLIVEIRA*; OCTÁVIO LUIZ FRANCO **; PAULO ROBERTO
QUEIROZ***

Abstract:

The microorganisms have been intensively studied for the acquisition of metabolites with antimicrobial activities and to the increase in infections caused by multiresistant microorganisms, the search or selection for the acquisition of new bioactive molecules is indispensable. Fungi have received attention in this group since the discovery of penicillin derived fungus *Penicillium chrysogenum*. In this context, the aim of this work was to isolate fungi present in the soil from Brasília-DF with antibacterial activity. From the preliminary tests antibiosis plate were selected isolates of fungi with potential antimicrobial capacity. The fungi were identified by microscopic characteristics, the macroscopic and transcribed intergenic region amplification (ITS). The two isolates were identified as *Penicillium citrinum* with 100% identity when aligned with sequences from the database Genbank. Both *P. citrinum* were grown in liquid fermentation then separated from the liquid part of the cellular part, the liquid part was freeze dried and its extracts have been tested by the broth microdilution method "U.S. National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) against the Gram positive bacteria *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, Gram negative *K. pneumoniae* ATCC 13883 and *E. coli* ATCC 8730, which has been achieved the ability to inhibit up to 100% in all tested bacteria when faced against the second filtrate. The results confirmed the antimicrobial potential presented by fungi were isolated from soil, with the possibility of isolating antimicrobial metabolites from these fungi studied.

Keywords: Soil fungi; Metabolites; *Penicillium citrinum*; antibacterial activity.