



AMANDA MELO ALVARES

**Potencial Antimicrobiano de Metabólitos Secundários de
Fungos do Gênero *Penicillium***

LAVRAS – MG

2019

AMANDA MELO ALVARES

**Potencial Antimicrobiano de Metabólitos Secundários de
Fungos do Gênero *Penicillium***

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dsc. Luís Roberto Batista

Orientador

LAVRAS – MG

2019

À meu pai, Israel Ferreira Alvares, por nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao departamento de Ciência dos Alimentos e ao laboratório de micologia e micotoxinas e todos os pesquisadores, pelo suporte e apoio prestado à minha pesquisa, e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal ao longo dos anos.

Ao meu orientador Luís Roberto Batista, pelo conhecimento, incentivo, confiança e inspiração.

À minha família, meu pai Israel e meu irmão Danilo, por estarem comigo em todos os momentos, sem nunca me deixarem desistir.

Ao meu namorado, Breno, por me apoiar e me incentivar em tantos momentos.

Às minhas grandes amigas, Carolina, Daniella e Aline, pela companhia e confiança.

Serei sempre grata!

RESUMO

O uso de substâncias produzidas através de microrganismos tem sido foco de pesquisas e estudos há muitos anos. A procura por metabólitos bioativos utilizados na produção de antimicrobianos tem aumentado, com potencial de uso nas áreas tecnológicas, na agricultura, na indústria farmacêutica, e química, com maior ênfase no controle de microrganismos patogênicos. O Brasil é reconhecido como um dos países com a maior diversidade microbiológica do mundo, isso devido a sua variedade de biomas, sua abundância em nutrientes, e seus compostos orgânicos e inorgânicos. Devido a essa biodiversidade existe uma maior probabilidade de encontrar novas moléculas para serem utilizadas no controle de microrganismos resistentes. Os microrganismos podem devido a alguns fatores, como seleção e mutação tornar resistente aos antimicrobianos existentes. Desta forma o objetivo desse estudo foi buscar métodos de combate e novas substâncias com ação antimicrobiana, entre eles, metabólitos secundários de fungos filamentosos, em especial o gênero *Penicillium*, primeiro genero descoberto com produtor de antimicrobiano. A metodologia utilizada consistiu em reativar, em meio YES, 58 fungos filamentosos da Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, CCDCA/WDCM1081, incubando-os durante 7 dias à 25°C. Posteriormente foi avaliada a produção de extratos utilizando três solventes diferentes: Metanol (CH₃OH), Acetonitrila (CH₃CN) e Água destilada, a partir da técnica de plug ágar. Para o teste de ação antimicrobiana foi realizado o teste de difusão em disco, desta forma *Escherichia coli* foi previamente ativada em meio BHI e diluída em meio TSB na concentração de 10⁸ UFC/L e inoculada (50 µL) Em uma placa de 15x20mm, contendo meio Ágar Muller Hilton, foram inoculados 50 µL da bactéria *Escherichia coli* na concentração de 10⁸ UFC/L previamente ativada em meio BHI e diluída em meio TSB, espalhados com alça de drigalski. Os discos foram posicionados equidistantes nas placas e adicionados de 10 µL do respectivo extrato. Os resultados foram avaliados de acordo com o diâmetro do halo de inibição após 24h. Entre os 57 fungos avaliados, 48 apresentaram produção de metabólitos antimicrobianos através de, pelo menos, um método de extração, representando 86%. No entanto, apenas seis obtiveram resultado satisfatório em todos os solventes, apresentando um halo maior que 20 mm de diâmetro. Esse resultado pode ser justificado por diversos fatores, entre eles, as condições de cultivo dos microrganismos, a espécie e o grau de sensibilidade desses microrganismos à concentração da batéria em questão. Entre os fungos analisados os que apresentaram maior halo de inibição foram os fungos *Penicillium sp. 18 e sp. 59*, com a média de 26 mm, a partir dos três métodos de extração. Entre os solventes utilizados, o metanol teve destaque pelo número de fungos encontrados com atividade antimicrobiana, 30 deles obtiveram atividade satisfatória a partir deste solvente, seguidos pela água destilada e Acetonitrila respectivamente. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar a viabilidade na produção de outros compostos. Considerando que os extratos analisados foram usados de maneira bruta, sem nenhuma técnica de purificação, o resultado obtido foi satisfatório.

Palavras chave: Fungos filamentosos, antimicrobianos, *E. coli*, *Penicillium*.

ABSTRACT

The use of substances produced through microorganisms has been the focus of research and studies for many years. Demand for bioactive metabolites used in antimicrobial production has increased, with potential use in technological, agricultural, pharmaceutical, and chemical fields, with greater emphasis on controlling pathogenic microorganisms. Brazil is recognized as one of the countries with the greatest microbiological diversity in the world, due to its variety of biomes, its amount of nutrients and its organic and inorganic compounds. Considering this biodiversity is more likely to find new molecules to be used to control resistant microorganisms. Microorganisms can cause some factors, such as selection and mutation making them resistant to existing antimicrobials. Thus, the objective of this study was to search for combat methods and new substances with antimicrobial action, including secondary metabolites of filamentous fungi, especially the genus *Penicillium*, the first generator discovered with antimicrobial producer. The methodology used was to reactivate, in YES medium, 58 filamentous fungi of the Microorganisms Culture Collection of the Department of Food Science of the Federal University of Lavras, CCDCA / WDCM1081, incubating them for 7 days at 25°C. Subsequently, the production of extracts was evaluated using three different solvents: Methanol (CH₃OH), Acetonitrile (CH₃CN) and distilled water, using the plug agar technique. For the antimicrobial action test the disk diffusion test was performed, thus *Escherichia coli* was previously activated in BHI medium and diluted in TSB medium at a concentration of 10⁸ CFU / L and inoculated (50 µL) in a 15x20mm plate containing Muller Hilton agar was inoculated with 50 µL of *Escherichia coli* bacteria at a concentration of 10⁸ CFU / L previously activated in BHI medium and diluted in TSB medium, spread with drigalski loop. The discs were placed equidistant on the plates and added with 10 µL of the respective extract. Results were evaluated according to the diameter of the inhibition zone after 24h. Among the 57 fungi evaluated, 48 showed production of antimicrobial metabolites through at least one extraction method, representing 86%. However, only six obtained satisfactory results in all solvents, presenting a halo larger than 20 mm in diameter. This result can be justified by several factors, including the conditions of culture of the microorganisms, the species and the degree of sensitivity of these microorganisms to the concentration of the bacterium in question. Among the fungi analyzed the ones that presented the greatest inhibition halo were the fungi. *Penicillium* sp. 18 and sp. 59, with an average of 26 mm, from the three extraction methods. Among the solvents used, methanol was highlighted by the number of fungi found with antimicrobial activity, 30 of them obtained satisfactory activity from this solvent, followed by distilled water and Acetonitrile respectively. Future studies should be performed to evaluate the feasibility of producing other compounds. . Considering that the extracts analyzed were used crude, without any purification technique, the obtained result was satisfactory.

Key words: Filamentous fungi, *Penicillium*, antimicrobial, *E. coli*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	OBJETIVO	9
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1	Biodiversidade microbiana	10
3.2	Fungos filamentosos: <i>Penicillium</i>	11
3.3	Bactérias: <i>E. coli</i>	14
3.4	Bactérias resistentes.....	15
3.5	Antimicrobianos.....	18
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Isolamento dos microrganismos	22
4.2	Inoculação da bactéria <i>E. Coli</i>	23
4.3	Preparo do extrato fúngico	24
4.4	Caracterização do potencial antimicrobiano dos fungos do gênero <i>Penicillium</i>	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1.	Extrações com Metanol (CH ₃ OH).....	27
5.2	Extrações com Acetonitrila (CH ₃ CN)	28
5.3	Extrações com Água destilada (H ₂ O).....	28
5.4	Potenciais Antimicrobianos	29
6.	CONCLUSÃO	32
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são substâncias químicas, de origem natural ou sintética, que têm a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos ou até mesmo destruí-los. Sua composição e propriedades definem seus espectros, seus mecanismos de ação e sua classificação. O primeiro antimicrobiando produzido por fungo foi descoberto em 1928, por Alexander Fleming, na época, foi observada a inibição do crescimento de *Staphylococcus* a partir do *Penicillium chrysogenum*, descobrindo o antibiótico Penicilina.

Diversas pesquisas demonstraram a capacidade dos microrganismos em se adaptar a novos ambientes e condições, com sintomas mais significativos e representando maior perigo para o ser humano, tudo isso devido ao uso indiscriminado de antibióticos e a sua distribuição pelo ecossistema, que selecionaram microrganismos cada vez mais resistentes. Para diminuir a presença de microrganismos resistentes, no Brasil foi criada uma resolução (RDC 44, 26 de outubro de 2010) para proibir a venda de antibióticos sem receita médica, a fim de evitar a automedicação e controlar o desenvolvimento de bactérias resistentes. A lista de antibióticos controlados conta com 119 substâncias e sua última atualização foi em 2011. Pesquisadores por todo o mundo têm encontrado novas maneiras de inibir esse fenômeno e buscam novas fontes de metabólitos com capacidade antimicrobiana.

De maneira geral, os fungos são comumente lembrados como principais deterioradores de alimentos, roupas, materiais em geral, além de serem causadores de doenças, micoses, irritações na pele e alergias. No entanto, a imagem social acerca dos fungos vem sendo alterada, ou seja, a população tem tomado ciência de suas outras funções e utilidades, como, por exemplo: a síntese do álcool etílico e dióxido de carbono para produção de bebidas alcoólicas, sua importância na produção de pães e massas, sua utilização na melhoria da palatabilidade de queijos, a produção de compostos aromáticos em produtos finos e a variedade de cogumelos.

A *Escherichia coli* é uma bactéria que compõe a microbiota intestinal de humanos e animais, auxiliando na degradação de compostos que chegam até nosso intestino e que tem uma função fisiológica de extrema importância. Na forma em que é apresentada em nosso organismo, não é capaz de causar nenhum dano, no entanto, existem diversas variações desse microrganismo que são patógenos e capazes de causar

doenças gastrointestinais, infecções urinárias e varias outras complicações, por meio de contaminação dos alimentos ou da água. A *Escherichia coli*, é uma bactéria termorresistente indicadora de contaminação fecal e é usada no controle de análises microbiológicas em vários segmentos, além de ser a bactéria que mais presente em casos de infecções humanas e animais, causando doenças e sendo caracterizada como a bactéria de maior risco para a saúde atualmente.

Considerando o risco elevado no contato com microrganismos patogênicos, é necessário que os métodos de combate sejam sempre eficazes. Considerando que os fungos representam a melhor fonte natural de compostos antimicrobianos pela sua baixa toxicidade em seres humanos, pelo baixo custo de produção e devido à eficiência dos seus metabólitos secundário em amplo espectro de bactérias, eles se tornam a melhor alternativa para o controle de bactérias patogênicas.

2. OBJETIVO

Realizar um screening de fungos filamentosos do gênero *Penicillium*, para a produção de metabólitos secundários, utilizando diferentes tipos de solvente, com potencial antimicrobiano, testados em *Escherichia coli*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Biodiversidade microbiana

Os microrganismos abrangem as bactérias, arqueas, fungos, protozoários e vírus, através dos processos metabólicos realizados pelos microrganismos ao longo da história foi possível criar uma atmosfera rica em oxigênio, possibilitando novas formas de vida (Ministério do Meio Ambiente, MMA, 2003). O termo biodiversidade pode ser definido de várias maneiras, seja pelo número de espécies e sua abundância relativa no seu habitat natural, ou através da ecologia molecular que define usando as diferentes sequências presentes no DNA (Garbeva et al., 2004). Øvreås (1998) define a biodiversidade microbiológica como "a variedade de espécies nos ecossistemas, bem como a variabilidade genética dentro de cada espécie".

Temos o hábito de associar os microrganismos com doenças e deteriorações. No entanto, a maioria desses microrganismos têm diversas aplicações, não só na manutenção do equilíbrio entre seres vivos e elementos químicos no meio ambiente, como também inúmeras aplicações comerciais, como a síntese de produtos químicos, produção de ácidos orgânicos, enzimas e álcool. A microbiologia foi evoluindo após a invenção do microscópio, antes disso, as pessoas sofreram de epidemias e doenças graves causadas por microrganismos que poderiam ter sido evitadas com o uso de antibióticos e vacinas, não conhecidos e disponíveis na época. (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012)

Há uma grande projeção nos estudos das espécies microbianas, especialmente a área de micologia. Os interesses em biodiversidade, meio ambiente, biotecnologia e conservação tornam a área de pesquisa extremamente promissora. Ainda assim, falta muito apoio financeiro para produzir resultados que tragam geração de receita em curto prazo, desvalorizando os estudos em identificação e caracterização de microrganismos, desconsiderando que suas descobertas trarão diversos benefícios a longo prazo no Brasil. Os habitats que não foram explorados oferecem uma enorme diversidade de espécies ainda não descobertas, considerando que a estimativa para o número de fungos do planeta é de 1,5 milhão e apenas 70 mil espécies foram descritas até agora (Hawksworth, 1991).

Olsen et al. (1986), ecologista pioneiro na pesquisa de sequenciamento filogenético na microbiologia, caracterizou algumas técnicas de identificação como promissoras e destacou sua importância na exploração da diversidade microbiana, facilitando diversos estudos a partir da biologia molecular, utilizando sequências de

nucleotídeos do gene que codifica RNA ribossômico 16S (rDNA), gene encontrado em todas as células procarióticas, com maior precisão e rapidez. Curtis et al. (2001) revelou uma enorme diversidade de microrganismos na natureza e enfatizou a necessidade de novos dados para a análise quantitativa desses microrganismos, tanto em termos de metodologia quanto em estimativas.

O monitoramento dos microrganismos em um determinado ecossistema pode ser útil na detecção de alterações ambientais, garantindo uma relação de confiança entre a diversidade e a sustentabilidade (TÓTOLA; CHAER, 2002). Trevors (1998) associa o conhecimento da estrutura da comunidade microbiana à criação de estratégias eficazes de conservação ambiental e indicadores de qualidade.

A pesquisa microbiológica depende do aprimoramento das técnicas de identificação, quantificação e análise estatística. Outro aspecto que merece atenção são os métodos utilizados atualmente para o cultivo de microrganismos “não-cultiváveis”, esse desenvolvimento é essencial na área da biotecnologia, levando em consideração que os microrganismos que desconhecemos e estão fora do nosso alcance de pesquisa, podem oferecer substâncias com diversos potenciais e funções. (Lambais et al., 2005)

3.2. Fungos Filamentosos: o gênero *Penicillium*

Penicillium é um gênero importante do filo Ascomycota encontrados naturalmente no meio ambiente nos mais diversos habitats, como solo, ar, ambientes extremos, em condições de salinidade, temperatura, pH e falta de água extremas. Além de sua flexibilidade, são conhecidos por serem um dos mais versáteis microrganismos por conter espécies capazes de solubilizar substâncias, promover o crescimento de plantas e produzir biosurfactantes (Yadav et al., 2018).

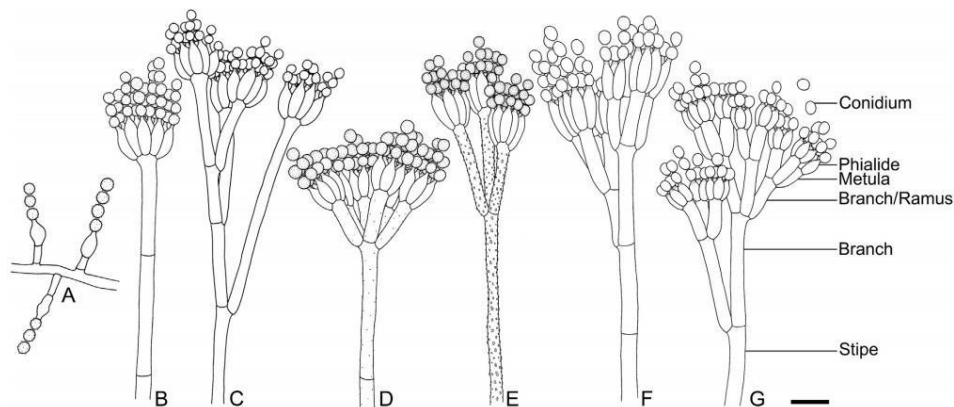
A primeira notificação da presença do fungo do gênero *Penicillium* foi em 1928 quando o primeiro halo de inibição, formado em placas contendo a bactéria *Staphylococcus*, foi noticiado pelo biólogo Alexander Fleming. O fungo descoberto foi classificado como *Penicillium notatum* e foi o microrganismo responsável pela criação dos primeiros antibióticos (Refai et al. 2015). O gênero *Penicillium* compreende mais de 350 espécies que produzem uma enorme variedade de compostos bioativos, a informação que temos acerca dos compostos e da versatilidade dos mesmos ainda é escassa (Rabha e Jha, 2018).

As células fúngicas agrupam-se em filamentos, podendo ou não apresentar septos entre elas, porém, mesmo quando presentes as funções metabólicas ocorrem sem impedimentos entre as células. Esses filamentos celulares são denominados hifas e o

agrupamento intenso de hifas constitui o micélio. É importante salientar que micélios fúngicos nunca constituem tecidos. (SILVA; COELHO, 2006) Na fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam os esporos, principais responsáveis pela propagação das espécies (BRASIL, 2010).

As colônias de *Penicillium*, geralmente, são de crescimento rápido, de coloração esverdeada, às vezes branca, consistindo, principalmente, de uma massa de conidióforos (Visagie et al., 2014). Sua classificação macromorfológica é dada por seu crescimento, cor, aparência e textura das colônias, em diferentes meios e condições, enquanto sua classificação micromorfológica é dada pela caracterização dos conidióforos, das filiares e seus ramos secundários de apoio, pelas ramificações e conídeos (Refai, El-Azid, Tawakkol, 2015).

Fig. 1. Padrão de ramificação de conidióforos observados em *Penicillium* e termos utilizados para descrever conidióforos. A: *Conidióforos com Fiálide solitários*. B. *Monoverticilado* C. *Bifurcado* D, E. *Biverticilado* F. *Triverticilado* G. *Quadriverticilado*. (10 μ m)



Fonte: Visagie et al. (2014).

Os fungos são heterotróficos e obtêm energia a partir da degradação de material orgânico, eles secretam enzimas no substrato em que estão e absorvem as moléculas resultantes da ação das enzimas. Dessa forma, além da obtenção de nutrientes, eles disponibilizam outras substâncias provenientes dessa reação para outros organismos, sendo assim participantes ativos de ciclos biogeoquímicos. (SILVA; COELHO, 2006)

Além do potencial biotecnológico dos fungos, eles são responsáveis pela

produção de alimentos, sua atividade fermentativa tem como propósito acentuar as características sensoriais dos alimentos, além de liberar substâncias benéficas para nosso organismo. É uma técnica muito apreciada pelos povos orientais, que usam essa tecnologia na fermentação de soja, trigo, arroz e outros cereais. (SILVA; COELHO, 2006)

As espécies fúngicas vêm sendo utilizadas no controle biológico de pragas pela sua habilidade em produzir substâncias fungicidas, conseqüentemente diminuem a busca por pesticidas sintéticos e inibem a incidência de fungos fitopatogênicos resistentes. Na área médica eles têm papel essencial na produção de medicamentos, são mais usados na produção de antibióticos e imunossuppressores, pode-se dizer que a quantidade de fungos que são descobertos através do potencial dos seus metabólitos secundários vêm crescendo cada vez mais (Takahashi et al., 2017).

Os fungos do gênero *Penicillium* são mais estudados por serem altamente difundidos, ter habilidade de produzir uma vasta gama de biocompostos úteis para atividade biológica. Seus metabólitos incluem antimicrobianos, antifúngicos, imunossuppressores, micotoxinas e agentes de redução do colesterol (Kumar et al., 2017). Refai et al. (2015) descreve como fungos capazes de produzir metabólitos antimicrobianos os fungos *P. chrysogenum*, *P. flavigenum*, *P. nalgiovense*, *P. Dipodomys* e *P. Griseofulvum*. Além da função antimicrobiana, descreve também diversos fungos com capacidade de produção para pigmentos, enzimas, anticancerígenos e micotoxinas.

De acordo com Hawksworth (1999), a maior biodiversidade microbiológica está em países tropicais, como o Brasil. Nesse mesmo estudo, estima-se que a quantidade de fungos descobertos até agora é de 4 a 6% do número total de fungos existentes na terra. OVREAS (1998) destaca que diversas técnicas foram criadas para a análise da estrutura e diversidade da comunidade bacteriana, no entanto, os métodos são ineficazes, uma vez que, apenas menos de 1% da população bacteriana pode ser cultivável em meios convencionais. O avanço está no conhecimento genético dessas espécies e nas suas relações com o ecossistema, assim como as pesquisas em microbiologia molecular.

A taxonomia é a identificação destes fungos utilizando dados morfológicos, como as características macroscópicas de cada fungo, incluindo o reverso da colônia, o aspecto das bordas, padrão de crescimento, coloração nos conídios e micélio, a textura, presença ou não de exudados ou pigmentações, e também utiliza dos meios microscópicos na

análise das hifas, forma e cor, presença de septos, arranjo dos esporos, além da velocidade de crescimento de cada organismo. Atualmente o método mais moderno é a identificação por biologia molecular, sendo conhecida como uma técnica mais precisa e que permite criar, no futuro, um banco de dados para identificação e caracterização dos microrganismos e seus ecossistemas (Takahashi et al., 2017). O grande problema dos métodos de identificação morfológica utilizados é a falta de precisão e a identificação confusa, em que os critérios morfológicos mais acurados dependem de um profissional experiente, evitando que a coleta de dados tenha variações de interpretação de acordo com o profissional (EMBRAPA, 2011).

Compreender a evolução desses microrganismos em diferentes condições ampliará nossos conhecimentos básicos a respeito do processo evolucionário e permitirá a melhora da avaliação do potencial ecológico durante as alterações do meio ambiente e saúde humana (Yadav et al. 2018)

3.3. Bactérias: *E. coli*

A bactéria *Escherichia coli* tem forma de bacilo, é Gram-negativa, não esporulada, anaeróbia facultativa e fermentadora de açúcares. Existem muitas estirpes de *E. coli*, desde formas comensais até formas patogênicas (ALVES, 2012). Seu tamanho varia de 1,1 a 1,5 por 2 a 6 µm, caracteriza-se por ser móvel por flagelos peritríqueos ou imóveis, não formadora de esporos, pertencente à família Enterobacteriaceae e o gênero *Escherichia*. (Hofling; Gonçalves, 2008)

Souza (2016) e o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) identificam como fontes de contaminação da *Escherichia coli* enteropatogênica os alimentos crus e mal processados, o contato com animais domésticos e silvestres, água, solo, fazendas e abatedouros bovinos. O alerta para a contaminação fecal com a bactéria *E. coli* não é limitado aos cuidados em casa e os centros de pesquisa encontraram indicadores da bactéria em locais como parques, piscinas públicas e zoológicos, ou seja, qualquer pessoa está susceptível à infecção bacteriana.

De acordo com a Organização Pan-americana de saúde (2018), a *E. Coli* está entre as bactérias resistentes mais relatadas. O problema não se limita à resistência contra os antibióticos existentes, mas pela dificuldade em limitar um perímetro de ação geográfico dessas bactérias. Com isso, em 2015, na 68ª assembléia mundial da saúde,

foi criado um plano internacional de combate à esses microrganismos, com programas sólidos de vigilância e monitoramento, o GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System), que tem objetivo de unir os dados a respeito de microrganismos resistentes por todo o planeta com o auxílio governamental e a colaboração da comunidade científica. As bactérias coletadas no GLASS por serem as bactérias de maior incidência contra os antimicrobianos são: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* e *Neisseria gonorrhoeae*.

De acordo com o Ministério da saúde, 36,9% dos casos de infecções alimentares, de 2009 a 2018, no Brasil, são provenientes das residências, seguido por restaurantes e padarias, com 15,8% dos casos, somando pouco mais de 3600 casos de doenças associadas à contaminação bacteriana. Entre os dez principais agentes causadores estão a *Escherichia coli* com a maior incidência, representando 24%, seguida pela *Salmonella sp.* com 11,2% e *Staphylococcus aureus* com 9,5% dos casos de surto. A fonte responsável pela maior parte dos surtos ainda é a água e os alimentos mistos, sendo a *E. coli* o agente etiológico de maior participação.

Entre casos de infecção hospitalar, os microrganismos responsáveis pelos maiores índices são *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e as espécies de Enterobactérias, não só pelo grande número de infecções mas também representando grande resistência aos antimicrobianos existentes em todo o planeta (FDA, 2007).

As bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* são identificadas como microrganismos de alta resistência aos antimicrobianos (Correia et al., 2007). Foram descritos seis patótipos provenientes da *E. coli*, a Enteropatogênica (EPEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enterotoxigênica (ETEC), Enteroagregativa (EAEC), Enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de difusão aderente (DAEC), que são os principais causadores de dores abdominais e diarreia. Entre as características que conferem patogenicidade à bactéria *E. Coli* estão sua capacidade de produzir toxinas e as proteínas envolvidas na invasão celular (SILVEIRA; MARQUES; MACHADO, 2013)

3.4. Bactérias resistentes

As bactérias existem há 3,5 bilhões de anos e estão presentes nos ambientes mais diversos e extremos, demonstrando sua grande capacidade de adaptação, que é

associada à estrutura genômica, que garante a troca de genes entre bactérias utilizando elementos não cromossômicos, como plasmídeos, transposons e bacteriófagos, que destroem as bactérias hospedeiras, mas que podem espalhar os genes bacterianos. A resistência antibiótica ocorre quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico por mutação espontânea de DNA ou por transformação e transferência de plasmídeos (Antonio et al., 2009).

Nos últimos anos nos deparamos com novas doenças ou a modificações de doenças que já conhecemos e que oferecem uma perspectiva de aumento na incidência nos próximos anos. Os fatores que justificam esse fenômeno incluem as mudanças evolutivas nos organismos existentes, a disseminação de doenças conhecidas para novas regiões ou populações, a degradação climática e alterações ecológicas que expõem a humanidade a agentes infecciosos incomuns, todos esses agentes causadores da resistência microbiana (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Segundo a União Européia, 700 mil pessoas morrem por ano devido às bactérias resistentes, como prioridades críticas estão *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*, resistentes a carbapenema (medicamento antibiótico de amplo espectro) e responsáveis por infecções graves e geralmente mortais (FIOCRUZ, 2017).

Os mecanismos de resistência antimicrobiana incluem a modificação ou destruição enzimática do antibiótico, a prevenção do acúmulo intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular ao antibiótico, por alterações nas moléculas alvo dos antibióticos e pela produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico, como enzimas extras por exemplo. Entre as bactérias gram-positivas com maior índice de resistência estão as bactérias do gênero *Enterococcus* e entre as bactérias gram-negativas, está a família das enterobactérias (Loureiro et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a resistência antimicrobiana à “capacidade de um microrganismo em impedir a atuação de um antibiótico” e atribui as causas ao diagnóstico precoce e muitas vezes errôneo, à prática de automedicação, assim como a prática de tratamento empírico, que possibilita a proliferação e evolução desses microrganismos, o abuso desses fármacos pela comunidade médica como tratamento universal ou até mesmo pela ordem natural da espécie. Segundo a Anvisa (2017), as consequências desse fenômeno incluem “o prolongamento da doença, o aumento da taxa de mortalidade, a permanência prolongada no ambiente hospitalar e a ineficácia dos tratamentos preventivos que comprometem toda a população.”

Além das más práticas já conhecidas de automedicação, o fator mais crítico é a ocorrência de bactérias resistentes nos alimentos, através da contaminação cruzada. Foram encontrados genes de resistência à ampicilina transmitidos por plasmídeos de *Salmonella* e *E. coli* em leite esterelizado e carne moída, foram encontrados também potenciais cepas patogênicas em leite integral fermentado, além de serem encontrados esses mesmos plasmídeos em alface romana, espinafre e brotos de alface, sendo a maior ocorrência ainda em produtos lácteos. Levando em consideração que os genes de resistência estão presentes no solo, água e material fecal humano ou animal, a produção de alimentos, seja pelas etapas de abate, irrigação, manipulação ou pós processamento, sofre extremo risco de contaminação, resultando em um aumento significativo no número de hospitalizações e risco invasivo de infecções e mortalidade (Verraes et al., 2013).

A evolução desses microrganismos modifica os fatores de virulência que podem levar uma doença apresentada de maneira aguda a se tornar crônica, e essa evolução depende de fatores como “como o tempo necessário para desenvolver resistência, a pressão na seleção de micróbios resistentes e a taxa de mutação de genes específicos” (MEENA, HNAME, SIDDHARDHA, 2019). De acordo com Costelloe (2010), a resistência aos antibióticos está associada à repetição de uso em um curto espaço de tempo, salientando a necessidade de alterar o tipo de fármaco quando o uso é necessário em um período menor que 12 meses. Zimmerman (2010) em um boletim sobre o uso indiscriminado de antibióticos sugere diversas opções no combate à microrganismos resistentes, entre elas, a redução do número de prescrições, posologias modificadas, diferentes tempos de tratamentos e dosagens, diminuição do uso de antibióticos com histórico de resistência, combinação de diferentes antimicrobianos e então o desenvolvimento de novos fármacos. Jim O’Nei (2016) defende a necessidade de campanhas públicas de conscientização, para o uso indiscriminado de antimicrobianos, para a melhora da higiene e condições sanitárias da população e declínio do uso de antibióticos por animais e liberação no meio ambiente, além de enfatizar a precisão de diagnósticos rápidos, o aumento do investimento em profissionais que atuam nessa área de pesquisa e conseqüentemente a procura de novos antibióticos.

O uso indiscriminado de antibióticos é considerado uma ameaça à saúde pública e o fator mais importante na geração de microrganismos resistentes, esse uso costuma ser atribuído exclusivamente para os seres humanos, no entanto, é sabido que

os antimicrobianos são utilizados em uma variedade de ambientes, entre eles fazendas, confinamentos e outras instalações de cuidados prolongados. É de extrema importância que o uso de antimicrobianos por animais seja levado em consideração nas projeções em resistência microbiológica (Hoezer et al., 2017). Arraes et al. (2013) abre a possibilidade de patógenos gastrointestinais resistentes estarem adquirindo uma posição vantajosa quando os pacientes são tratados com antibióticos por outras razões médicas, já considerando que os tratamentos médicos existentes podem falhar.

Estrela (2018) associa a dificuldade no combate aos microrganismos resistentes à ausência de inovação e pesquisa, e complementa que os mecanismos de combate não estão acompanhando a velocidade evolutiva desses microrganismos. Essa falta de investimento é relacionada à baixa lucratividade para as indústrias farmacêuticas, e como consequência, ocorre desabastecimento, principalmente em países subdesenvolvidos, trazendo de volta doenças que estavam anteriormente controladas, criando uma situação crítica na saúde pública. Países que possuem o direito à saúde para todos os habitantes, como o Brasil, devem garantir que os interesses comerciais não sejam superiores aos interesses de saúde pública e por essa razão, o Brasil ganha destaque no combate às bactérias resistentes.

O'Neil (2016) estima que o número de óbitos causados por bactérias resistentes seja de 10 milhões em 2050, como estima também que o custo para a ação global sobre as bactérias resistentes seria de 40 bilhões de dólares para os próximos dez anos, com uma projeção de 15 novos antibióticos por década, dando enfoque nas bactérias de maior necessidade e em descobertas alternativas ao uso dos antibióticos, entre elas, vírus modificados, probióticos, enzimas, técnicas da engenharia genética com altas práticas de prevenção.

3.5. Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias com a capacidade de destruir microrganismos ou inibir sua proliferação. Podem ser produzidos por outros microrganismos ou podem ser total ou parcialmente sintéticos. Seu objetivo é tratar infecções, diminuindo ou eliminando microrganismos patogênicos. Os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com sua origem, atividade bacteriana, mecanismo de ação e espectro de ação.

- I. Origem do antibiótico: se divide em natural, sintético ou semi-sintético;
- II. Atividade bacteriana: pode ser subdivida em bacteriostático, como inibidor de crescimento do patógeno e bactericida, responsável pela eliminação total do microrganismo;
- III. Mecanismos de ação: alteração da estrutura da parede celular, alterações na membrana plasmática, interferência genética e inibição da síntese proteica;
- IV. Espectro de ação: para bactérias gram-positivas ou gram-negativas, tipo de microrganismos ação eficiente e amplo espectro.

Fonte: Adaptado de Melo; Duarte; Queiroz, 2012;

Um grande número de extratos fúngicos e produtos extracelulares tem capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, especialmente o fungo filamentoso do gênero *Penicillium*. Após a descoberta da Penicilina, diversos fungos do mesmo gênero são usados na procura de metabólitos secundários com atividade biológica de inibição de outros microrganismos (Rancic et al., 2006). A Penicilina é utilizada principalmente contra bactérias gram-positivas, no entanto, se apresentada de maneira estável, pode ter grande utilidade em amplo espectro, sendo utilizada também no combate de bactérias gram-positivas (NCCLS, 2005)

Os metabólitos secundários são produtos naturais que geralmente apresentam baixa massa molecular, estrutura química complexa e alto potencial farmacológico. Podem ser produzidos como mecanismo de defesa contra predadores, podendo estar envolvidos no processo reprodutivo de algumas espécies, ou serem produzidos para desenvolver funções biológicas específicas da espécie que o produz. Esses metabólitos são essenciais para a regulação, equilíbrio e sobrevivência fúngica (Takahashi et al., 2017).

Os fungos são conhecidos pela produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários ativos, entre eles alcalóides e peptídeos. A atividade desses metabólitos não se limita à inibição de atividade bacteriana, mas também possuem propriedades anticancerígenas e antiinflamatórias em alguns casos, o que os torna tão úteis e de tanta importância (Sargo et al., 2007).

A produção de metabólitos está diretamente ligada ao ambiente, disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e outros fatores de exposição aos quais os microrganismos estão, qualquer alteração nessas condições pode alterar o

comportamento do microrganismo e favorecer a produção de metabólitos diferentes do esperado. Essas modificações relacionadas ao ambiente do microrganismo foram relatadas na abordagem da teoria OSMAC (One Strain-Many Compounds), que consiste em expor o microrganismo à diversos fatores para a análise completa dos metabólitos produzidos (VanderMolen; Haja; Oberlies, 2013). Além de alterações nos tipos de metabólitos gerados, as alterações ou otimizações feitas nas condições de produção desses metabólitos podem circunstancialmente aumentar a quantidade de substâncias produzidas e até sua eficiência. (Kiranmayi et al., 2018)

Keller (2019) sugere que a riqueza de metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos é “amplamente inexplorada” quando analisamos dados moleculares. Tais substâncias são utilizadas com diversos propósitos e são cruciais no desenvolvimento e interações entre organismos para os fungos.

Os metabólitos podem ser categorizados em primários e secundários, os primários incluem carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, entre outros, e são responsáveis essencialmente pelo desenvolvimento, crescimento e reprodução dos microrganismos. Os metabólitos secundários são gerados por reações enzimáticas, após a fase de crescimento dos microrganismos em uma fase estacionária, modificando a síntese dos metabólitos primários, e a partir deles, produzindo compostos com potencial antibiótico, alcalóides, toxinas, entre outros. Mais de 50 mil metabólitos bioativos foram encontrados nos últimos anos, entre eles, 17 mil são antibióticos. Ainda que os fungos filamentosos sejam a melhor fonte de extração de compostos antimicrobianos, a emergência de novas doenças causou um aumento significativo nas pesquisas, expandindo a procura por compostos de baixo peso molecular, que podem ser usados como pesticidas, herbicidas, inibidores enzimáticos e etc.. Os metabólitos secundários são capazes de induzir o crescimento, sobrevivência e auxiliar no processo de adaptação dos fungos em qualquer ambiente (Kumar et al., 2017).

A partir da descoberta dos métodos de inibição bacteriana através dos antibióticos, o desenvolvimento de novas drogas tem crescido e a resistência à esses medicamentos era insignificante pois sempre havia uma droga nova para combatê-la, logo, foram criadas 14 novas classes de antibióticos entre 1935 e 2003, trazendo-nos ao problema atual da resistência microbiana (DORON; DAVIDSON, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.1. Reativação dos fungos filamentosos

Foram utilizados 57 fungos, preservados na Coleção de Cultura de Microrganismos, CCDCA/WDCM1081 de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos, situado no Campus da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG. Os fungos foram coletados a partir de amostras do solo do quadrilátero ferrífero, Tanto os fungos filamentosos quanto as bactéria se encontravam armazenados em freezer -80 °C.

Os isolados foram reativados em triplicada no meio Yeast Extract Sucrose Agar (YES, Frisvad 1981) (composição Tabela 1), por ser um meio que aumenta a produção de metabólitos excretados para o meio de cultura (Visagie et al., 2014) e por ser uma excelente fonte de carbono, regulando a biossíntese de metabólitos secundários (Kumar et al., 2017). Utilizou-se o método “Hyphae Tip” que consiste em recolher uma amostra com um objeto de ponta e depositá-lo na placa contendo o meio. (EMBRAPA, 2011).

As placas foram incubadas durante sete dias a 25°C em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand).

Tabela 1. Formulação do meio YES.

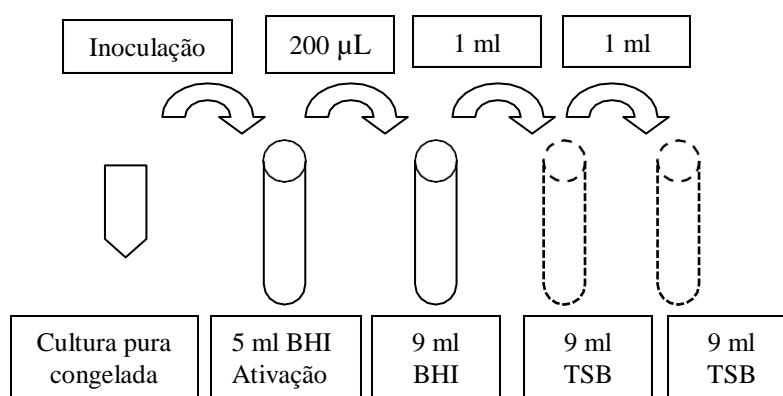
Substância	Quantidade	Marca
Água destilada	1 litro	
Extrato de levedura	20 g	ACUMEDIA
Sacarose	150 g	Êxodo científica
Ágar-agar	15 g	MICROMED
Solução metálica ¹	1 ml	

¹ Solução metálica: Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,5% e Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1%.

4.2 Preparo do inóculo de *E. coli*

De acordo com a Figura 2, a bactéria utilizada neste estudo, *Escherichia coli* foi reativada inoculando uma alçada da cultura pura em 5 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubada em estufa BOD por 24h a 37°C posteriormente 200 µL foram transferidos para um tubo contendo 9 ml de meio BHI e incubada em estufa BOD por 24h a 37°C, sendo 1 ml transferido para um tubo contendo 9 ml de meio TSB. A diluição em meio TSB (composição na tabela 3) foi repetida de acordo com a concentração da bactéria e seu resultado no espectrômetro.

Figura 2. Etapas de ativação e incubação da bactéria pura *E. coli*.



Fonte: Do autor, 2019.

O meio BHI (composição na tabela 2) sem inoculação foi utilizado como teste branco. O meio TSB contendo a bactéria na

absorbância de 625 nm, apresentou valores entre 0,07 e 0,1, para uma concentração de 10^8 UFC/L, segundo o padrão McFarland de turbidez nº 0.5.

Tabela 2. Formulação do meio BHI.

Susbtância	Quantidade	Marca
Água destilada	500 ml	
Brain Heart Infusion	18,5 g	HIMEDIA

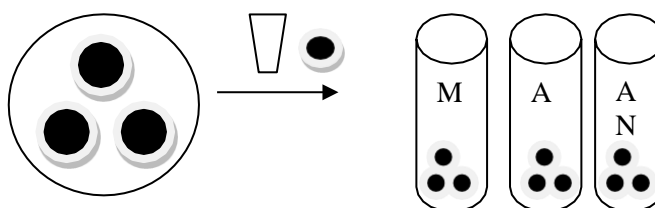
Tabela 3. Formulação do meio TSB.

Susbtância	Quantidade	Marca
Água destilada	500 ml	
Tryptic Soy Broth	15 g	Fluka Analytical

4.3. Preparo do extrato fúngico

Após os 7 dias de incubação, os fungos filamentosos foram retirados das placas através do método Plug Agar descrito por Filtenborg e Frisvad (1980), e transferidos para tubos de ensaio, contento o solvente a ser utilizado. Foram extraídos três plugs de cada fungo para cada tubo, como mostrado na Figura 3.

Fig. 3. Esquema de extração pelo método plug ágar. M: Metanol, A: Água destilada e AN: Acetonitrila.



Fonte: Do autor (2019)

A extração foi feita com Metanol (CH_3OH), Água destilada (H_2O) e Acetonitrila ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$). Os solventes foram selecionados de acordo com sua polaridade e possível afinidade com os

compostos produzidos pelo microrganismo. Cada tubo contendo 1 ml do solvente foi agitado a 2800 RPM por um agitador vortex durante 2 minutos, até o material ser totalmente liberado no meio. Após esse processo, os solventes químicos foram evaporados de acordo com sua temperatura de ebulição, 64,7°C para o Metanol e 82°C para Acetonitrila. O extrato produzido com água destilada não foi exposto à evaporação.

O resíduo proveniente da extração com metanol foi suspenso em sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Pharmanostra), e o material residual do tubo contendo Acetonitrila foi suspenso em 1 ml de água destilada para evitar qualquer degradação dos compostos extraídos. Ambos agitados novamente através do agitador vortex até que ser totalmente solubilizado no meio, formando um extrato fúngico bruto.

4.4. Screening do potencial antimicrobiano dos fungos do gênero *Penicillium*.

O inóculo preparado de *E coli* descrito no item 4.2 foi inoculado em meio Agar Müeller Hilton em placas de 15x20 mm utilizando 50 µL e espalhadas por alça de drigalski. O meio Agar Müeller Hilton é conhecido por oferecer boas condições de desenvolvimento para os principais patógenos (Mamizuka, 1982).

Os extratos foram aplicados (10 µL), diretamente em papel filtro com 5mm de diâmetro, pelo método de disco-fusão Kirby-Bauer, e colocados sobre o meio na placa, levemente pressionados, em uma distância média de 3cm cada um e 1,5 cm aproximadamente da borda. Foram feitos os controles negativos, utilizando 10 µL de DMSO e o controle positivo utilizando 10 µL clorafenicol 1%, também em disco, totalizando 12 discos por placa. As placas foram incubadas em estufa BOD durante 24h, à 37°C. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Tabela 4. Formulação meio Ágar Müeller Hilton

Susbtância	Quantidade	Marca
Água destilada	1 litro	
Ágar Müeller Hilton	38 g	KASVI

O resultado é dado a partir do halo de inibição formado pelos discos contendo o extrato fúngico bruto, o halo formado pelo disco contendo clorafenicol foi de 20 a 27 mm.

Para considerar como um halo de inibição foi utilizado como padrão o tamanho mínimo de 20 mm de diâmetro, determinado pela norma de sensibilidade de antimicrobianos da Anvisa (2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados ao todo 57 microrganismos do gênero *Penicillium* para produção de metabólitos com potencial antimicrobiano, entre esses, 49 microrganismos apresentaram o halo de inibição a partir do extrato de pelo menos um dos solventes, representando um total de 86%. Foram considerados com atividade ótima apenas seis fungos que apresentaram potencial em todos os extratos, estão localizados na tabela 5.

Os fungos foram identificados apenas à nível macro e microscópico e ainda não apresentam dados específicos sobre sua espécie. Todos os fungos utilizados foram coletados na área do quadrilátero ferrífero, na região de mata atlântica, que é caracterizada por ser uma região com alto depósito de minério de ferro, com riqueza de flora e características semelhantes aos biomas de Cerrado e Mata Atlântica (Azevedo et al., 2012). Microrganismos do solo são agentes promissores na produção de compostos bioativos e são comprovadamente diversos a partir de sua estrutura química e propriedades fisiológicas.

Os compostos bioativos são divididos entre compostos voláteis e compostos solúveis, os compostos voláteis são subdivididos entre terpenos, compostos nitrogenados, ácido indolacético e pirazinas, que são facilmente evaporados no meio ambiente. Os compostos solúveis ou compostos extracelulares são compostos que sobrevivem em condições extremas e que tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antimicrobianas, utilizados pelos microrganismos como mecanismo de defesa aos predadores. Espera-se, que em um microrganismo apenas, seja encontrado um grande número de metabólitos secundários a partir das substâncias solúveis, e cada metabólito possui sua própria estrutura química, com uma função específica (MEENA, HNAME, SIDDHARDHA, 2019).

A relação entre os diâmetros dos halos de inibição e os reagentes utilizados estão descritos no gráfico 1.

Fonte: Do autor, 2019.

5.1. Extrações com Metanol (CH₃OH).

Entre os solventes mais utilizados em processos de extração está o metanol (CH₃OH), o princípio utilizado na escolha do reagente depende de sua polaridade. Substâncias como o metanol (CH₃OH) possuem valores de momento de dipolo próximos ao da água (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013). Diversas pesquisas demonstram a afinidade do metanol para a extração de substâncias como compostos fenólicos, antioxidantes, corantes, entre outros. O efeito sinérgico entre o reagente e os compostos presentes nos fungos se mostrou maior e por isso o número de metabólitos aparentes extraídos em metanol são maiores do que em água destilada.

Diversos estudos citam o metanol como reagente utilizado na produção de extratos fúngicos com resultado satisfatório quanto à produção de metabólitos secundários com capacidade antimicrobiana. Gharaei-Fathabad et al. (2014) encontraram halos de inibição de até 30 mm em *E. coli* e Lihan et al. (2014) encontraram halos de até 34 mm de diâmetro para extratos dissolvidos em metanol e aplicados em *Lysteria monocytogenes*. Sondeergard et al. (2016) utiliza uma mistura de metanol, etanol e diclorometano, em uma análise acerca de metabólitos secundários de fungos do gênero *Fusarium*, demonstrando grande eficiência e versatilidade do solvente na dissolução de compostos fúngicos. Na maioria dos estudos que envolvem screening de fungos ou apenas dos metabólitos produzidos envolve a diluição em metanol ou a utilização do

mesmo na purificação através da cromatografia líquida, como mostra Schürmann et al. (2010).

Entre os fungos avaliados, 30 deles apresentaram atividade antimicrobiana quando extraídos com metanol, o número foi superior ao dos solventes Acetonitrila e água destilada, além de apresentar maior quantidade de fungos com propriedade antimicrobiana, apresentou também maior número de fungos com halo de inibição entre 11 e 30 mm de diâmetro, sendo o solvente de maior destaque entre os extratos, demonstrado no gráfico 1.

5.2. Extrações com Acetonitrila (CH₃CN)

O reagente Acetonitrila (CH₃CN), foi utilizado com propósito de contrapor a polaridade do reagente metanol (CH₃OH) para extrair uma variedade maior de compostos orgânicos, levemente solúvel em água. A Acetonitrila (CH₃CN) é usada principalmente como solvente em análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em diluições com água, na identificação de compostos produzidos por fungos pelo fato de ser transparente e facilitar a leitura. É conhecido como um bom solvente, com um poder de dissolução razoavelmente bom. Acetonitrila é utilizada quando se necessita de um solvente orgânico com alta constante dielétrica, como solvente em titulações não aquosas.

Dos fungos avaliados, 21 apresentaram capacidade de produzir metabólitos secundários com potencial antimicrobiano a partir da extração com o reagente Acetonitrila (CH₃CN), no entanto, foi o reagente que apresentou os menores diâmetros de halo de inibição, sendo o mais representativo para halos de 1 a 10 mm, no entanto, o menos significativo para halos entre 11 e 30 mm. Entre os reagentes utilizados, a Acetonitrila foi o que apresentou menos eficiência na solubilização dos compostos desejados. Esse resultado não deve ser utilizado como critério de exclusão do reagente, já que os compostos não foram identificados.

5.3. Extrações com Água destilada (H₂O)

A água destilada foi utilizada como solvente neutro. Entre os extratos fúngicos produzidos, 26 deles obtiveram o halo de inibição, resultado semelhante ao do extrato obtido por metanol, visto que a polaridade é a mesma. Esse resultado demonstra que a polaridade não é o único fator que deve ser

levado em consideração na escolha de reagentes para a extração fúngica. A água não tem o poder de degradar quimicamente nenhum dos possíveis metabólitos fúngicos. Além da sua neutralidade, a suspensão dos plugs em água mostrou que os resultados podem ser satisfatórios mesmo sem aplicação de altas temperaturas, o que permite avaliar se os metabólitos encontrados nos extratos fúngicos extraídos com água destilada diferem dos outros após o processo de evaporação ou não.

Veerasingam et al. (2018) encontram valores semelhantes de diâmetro dos halos de inibição com extratos fúngicos produzidos utilizando água destilada como solvente quando comparados com o diâmetro formado por tetraciclina, aplicados em diversas bactérias.

5.5. Potenciais antimicrobianos

Tabela 5. Microrganismos que apresentaram halo de inibição a partir de todos os solventes.

<i>Espécie</i>	<i>Diâmetro do halo de inibição (mm)</i>		
	<i>Metanol</i>	<i>Acetonitrila</i>	<i>Água destilada</i>
sp.18	26	21	22
sp.23	23	22	21
sp 30	25	20	23
sp 07	21	22	20
sp. 59	26	24	23
sp 70	24	20	21

Os microrganismos que apresentaram halo de inibição nos três extratos estão apresentados na tabela 5 e possuem halos que variam de 20 a 26 mm, sendo o metanol responsável pelos extratos com maiores halos de inibição. Quando comparados, os extratos feitos a partir da Acetonitrila foram os que apresentaram menor média no tamanho dos halos.

Entre os 57 microrganismos testados, apenas oito deles não apresentaram atividade antimicrobiana alguma, seja pela ausência total do halo de inibição ou pelo diâmetro não visível em condições ótimas de iluminação. Este fato pode ser justificado por diversas razões, entre elas, a concentração bacteriana estar além da potencialidade do antimicrobiano, as condições de extração não foram ideais para essas espécies ou os fungos não possuem esse potencial. Os microrganismos que não apresentaram halo de inibição em nenhum dos testes estão na tabela 6.

Mesmo que esses reagentes, Metanol e Acetonitrila, sejam utilizados em diversas áreas, não se sabe ao certo se os microrganismos testados são susceptíveis à

algum nível de degradação por esses químicos. São fungos que possuem

Propriedades satisfatórias, levando em consideração sua baixa restrição ao crescimento em diferentes meios e à produção de metabólitos a partir de diferentes métodos de extração, mostram assim grande potencial biotecnológico, não só pela possibilidade de um processo de purificação com menor custo, mas pela resistência dos compostos que não foram degradados e que provavelmente resistam a condições adversas de exposição.

Tabela 6. Extratos fúngicos que não apresentaram halo de inibição em nenhum dos métodos de extração.

Espécies (<i>Penicillium</i>)
sp. 11
sp. 66
sp. 12
sp. 43
sp. 47
sp. 54
sp. 73
sp. 92

A síntese dos metabólitos secundários envolve inicialmente a polimerização de metabólitos primários por enzimas essenciais ou estruturais, esses metabólitos primários dão origem a enzimas adicionais que podem alterar significativamente os bioativos desses metabólitos e que são responsáveis por definir a classe química dos metabólitos secundários que são gerados. Esses metabólitos podem ser gerados com diversos propósitos, entre eles a defesa, auto-desenvolvimento e proteção contra substâncias tóxicas. (KELLER, 2019)

Entre os mecanismos de ação desses metabólitos estão o ataque nas interações proteicas e na interferência nos mecanismos de comunicação do patógeno, esses metabólitos podem ser caracterizados pela eliminação total do patógeno ou até mesmo limitar a resistência do microrganismo ao antibiótico (MEENA, HNAME, SIDDHARDHA, 2019).

Rabha e Jha (2018) descrevem a diversidade metabólica do gênero *Penicillium* relacionando à metabólitos de atividade antimicrobiana como Griseofulvina, encontrada em *P. griseofulvum*, citrina produzida por *P. chrysogenum* e Agroclavina I por *P. waksmanii*, contidas na classificação de compostos Policetídeos. Na classe das dicetopiperazinas alcalóides foram encontradas Brevianamidas A e B, produzidos por *P. chrysogenum* e *P. brevicompactum*. Na classe das quinolinas alcalóides está o

metabólito Quinocitrina A e B produzidos por *P. citrinum* e *P. waksmanii*. E enfim, na classe dos aminoácidos estão as xantociclinas e as questiomicinas produzidas pelo fungo *P. expansum*.

O modo de ação dos metabólitos secundários provenientes de fungos filamentosos é devido a interações proteicas da célula causada pela geração de compostos fenólicos e tem como consequência a alteração da permeabilidade da parede celular, permitindo a perda de biomoléculas de dentro das células, e esse efeito afeta todo funcionamento da membrana, como a absorção de nutrientes, síntese de proteínas e ácidos nucleicos e atividade enzimática. Esses mesmos compostos fenólicos em baixas concentrações podem inibir atividade enzimática, enquanto em alta concentração podem induzir a desnaturação de proteínas. Ácidos graxos de cadeias longas são conhecidos pelo alto potencial inibitório em bactérias gram-positivas, seu mecanismo consiste em perturbar a parede celular e inibir a replicação genética e pode ter mais eficiência do que ácidos graxos de cadeias curtas (Pisoschi et al., 2017).

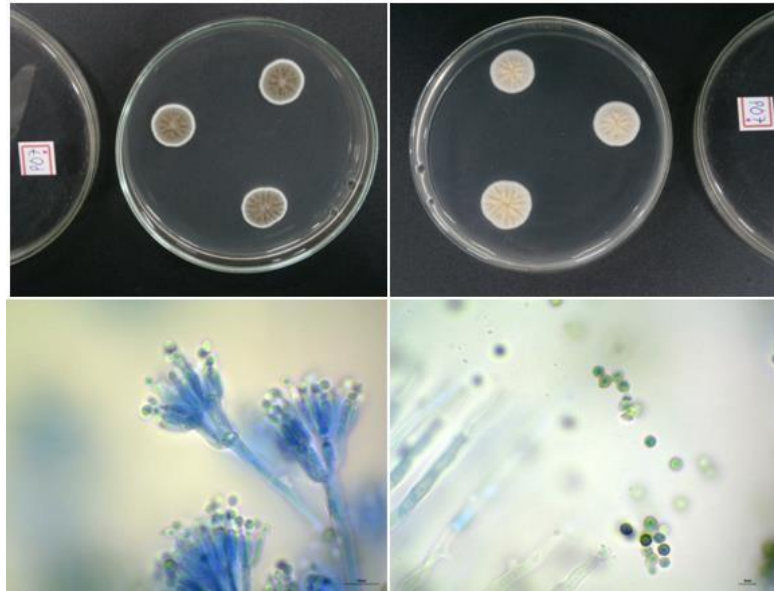
Kumar et al. (2017) agrupa diversos mecanismos de ação de metabólitos secundários provenientes de fungos filamentosos do gênero *Penicillium*, descritos pela hiperpolarização das células bacterianas, alterando a conformação dos receptores e impedindo a comunicação do sistema nervoso central, inibição da síntese proteica e conformação do DNA e produzindo micotoxinas. A determinação dos padrões nutricionais de cada microrganismo é de extrema importância na otimização da produção desses metabólitos. Parâmetros como pH, temperatura, umidade, agitação, tempo de incubação e concentração de extrato alteram substancialmente o mecanismo de crescimento do fungo e conseqüentemente a produção desses compostos, seja quantitativamente quanto qualitativamente.

6. CONCLUSÃO

Entre os fungos estudados acerca da produção de metabólitos antimicrobianos, o gênero *Penicillium* é o principal, não só pelo seu potencial reconhecidamente natural de produzir tais metabólitos, mas pela sua diversidade e sua capacidade de adaptação e difusão. Entre os fungos analisados, os que apresentaram potencial, levando em consideração a atividade antimicrobiana satisfatória nos três extratos, foram *Penicillium. sp 18*, *P.sp 23*, *P. sp 30*, *P. sp 07*, *P. sp 59* e *P. sp 70*, com halos que variam de 20 a 26 mm de diâmetro. O reagente metanol foi o que apresentou maior eficiência na extração desses metabólitos, com o maior número de fungos positivos para antimicrobianos e os maiores halos de inibição. Entre os reagentes, Acetonitrila obteve o resultado menos satisfatório, não só pela quantidade de fungos com halo inibitório menor que 20 mm, inferior aos outros, como também pelo tamanho médio que esses halos foram apresentados.

A pesquisa inicial de descoberta dos fungos que possuem esse potencial abre diversas possibilidades, incluindo a purificação dos extratos, a análise de aplicação desses fungos em outros meios e condições, a avaliação de eficiência desses metabólitos em bactérias gram-positivas e a otimização do processo de cultivo dos fungos para produção desses metabólitos.

ANEXO 1

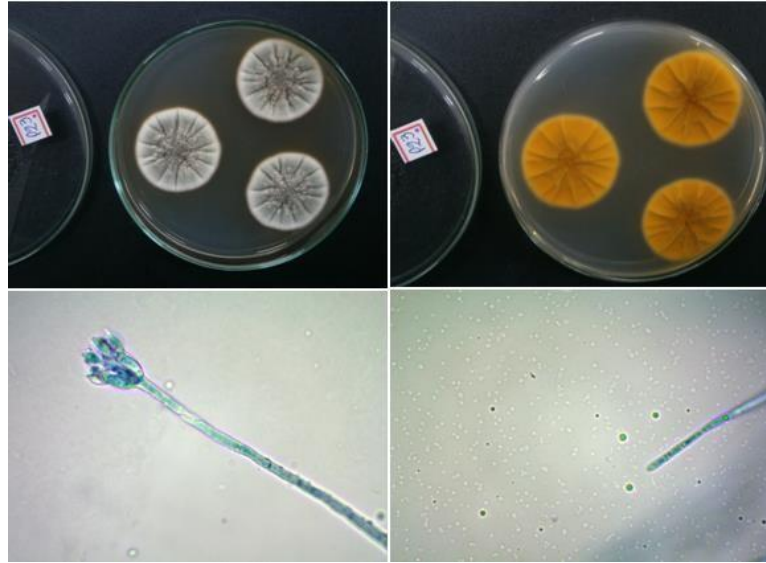
Figura 4. Macro e microrfologia de *Penicillium sp 07*

Fonte: Micoteca da UFLA (2018)

Figura 5. Macro e microrfologia de *Penicillium sp 18*

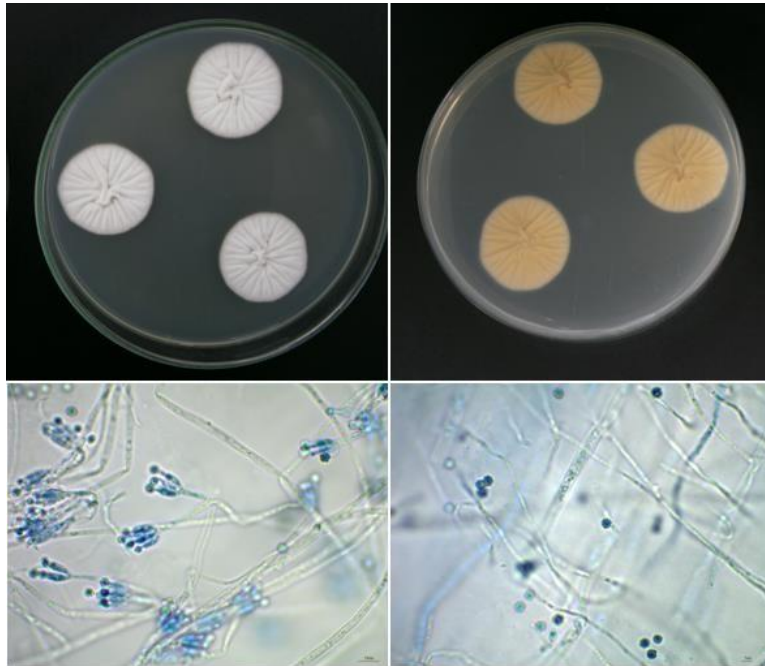
Fonte: Micoteca da UFLA (2018)

Figura 6. Macro e microrfologia de *Penicillium sp 23*



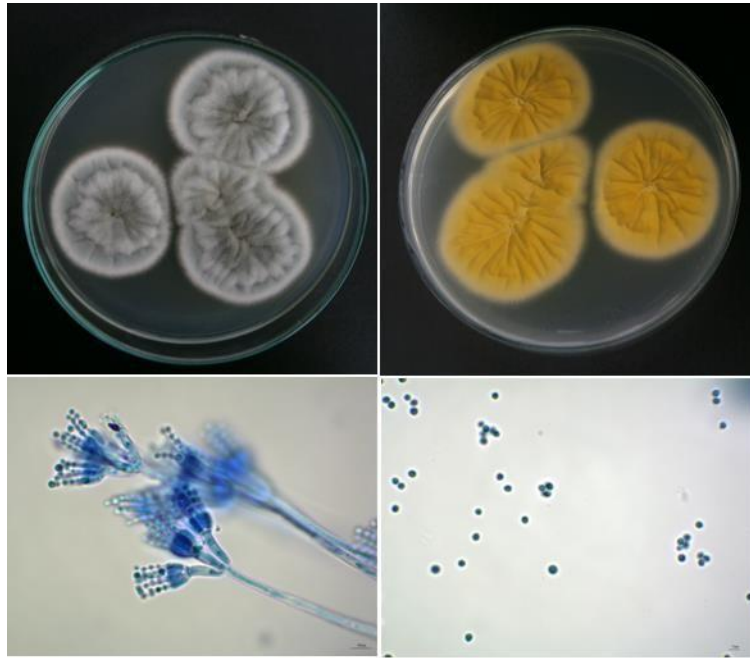
Fonte: Micoteca da UFLA (2018)

Figura 7. Macro e microfologia de *Penicillium* sp 30



Fonte: Micoteca da UFLA (2018)

Figura 8. Macro e microfologia de *Penicillium* sp 59



Fonte: Micoteca da UFLA (2018)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIO, Nayara da Silva et al. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 7, n. 12, jan. 2009. Semestral.

AZEVEDO, Ursula Ruchkys de et al. **Geoparque Quadrilátero Ferrífero**. Geoparques do Brasil. 2012

BRASIL. Leonor Silveira. Instituto Nacional de Saúde. **Patótipos de *Escherichia coli* associados a infecções entericas entre 2002-2012**. 8. Departamento de Doenças Infecciosas, 2013. 3 p.

BRASIL. Nccls. Anvisa (Org.). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**. 8. ed. : 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde (Org.). **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil: Informe 2018**. Brasil: Sus, 2018.

CABRAL, L. G.; MENESES, J.; PINTO, P.; FURTADO, G.. Racionalização de antimicrobianos em ambiente hospitalar. **Rev Soc Bras Clin Med.**, São Paulo, SP, ano 2018, ed. 16, p. 59-63, 7 jul. 2015.

CORREA, Carlos et al. ETIOLOGIA DAS INFECÇÕES DO TRACTO URINÁRIO e sua Susceptibilidade aos Antimicrobianos. **Acta Med Port**, Bragança, p.543-549, 9 maio 2007.

DIAS, I. E.. **Interação de *Penicillium spp* E *Aspergillus flavus* com Sementes e Grãos de Milho**. 2016. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

DORON, Shira; DAVIDSON, Lisa E.. Antimicrobial Stewardship. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 11, p.1113-1123, nov. 2011. Elsevier BV.

FARFÁN-GARCIA, Ana Elvira et al. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. **Rev Chilena Infectol**, Santander, p.438-450, 16 maio 2016

GHARAEI-FA, E.; TAJICK-GHA, M.a.; SHAHROKHI, N.. Antimicrobial Properties of *Penicillium* Species Isolated from Agricultural Soils of Northern Iran. **Research Journal Of Toxins**, v. 6, n. 1, p.1-7, 1 jan. 2014.

HOFLING, J. F.; GOLÇALVEZ, R.B.. Microscopia de luz em microbiologia: Morfologia bacteriana e fúngica. Porto Alegre: Artmed, 2008.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.c.; SAMSON, R.a.. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies In Mycology**, v. 70, p.53-138, set. 2011. Elsevier BV.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**. v. 17, n. 3, p.167-180, 10 dez. 2018. Springer Nature.

KIRANMAYI, M. U. et al. Optimization of Culturing Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Pseudonocardia* sp. VUK-10. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p.174-181, set. 2011. Informa UK Limited.

KUMAR, A. et al. Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Penicillium*. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p.47-68, 2018. Elsevier.

LIHAN, Samuel et al. Screening For Antimicrobial Activity Of Fungi In Soil Samples Collected From Kubah National Park. **International Journal Of Scientific & Technology Research**, Sarawak, v. 3, n. 2, fev. 2014.

LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p.77-84, jan. 2016.

MAMIZUKA, E. M.. **Controle de qualidade da prova de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos**. 1982. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

MARTINS, C. R.; LOPES, W; ANDRADE, J. B. SOLUBILIDADE DAS SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS. **Quim. Nova**, Salvador, v. 36, n. 8, p.1249-1255, jul. 2013.

MONTEIRO, Mônica Cristina Pereira. **Identificação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do Cerrado**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (Brasil). Organização Pan-Americana de Saúde . “Novos dados revelam níveis elevados de resistência aos antibióticos em todo o mundo”. 29 jan. 2018.

PISOSCHI, A. M. et al. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 143, p.922-935, jan. 2018. Elsevier BV.

RANĀÍĆ, A. et al. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from

the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 22, n. 1, p.80-84, jul. 2006. Elsevier BV.

REFAI, Mohamed; EL-YAZID, Heidy Abo; TAWAKKOL, Wael. **The genus *Penicillium*: A guide for historical, classification and identification of *Penicillium*, their industrial applications and detrimental effects.** 2015. 157 f. Cairo University, Cairo, 2015.

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ, 25., 2019, Poços de Caldas. **Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários do fungo *Penicillium griseoroseum*.**

ROMANO, Stefano et al. Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 16, n. 7, p.2-29, 23 jul. 2018. MDPI AG.

SAMSOM, Robert A.; PITT, John I. **Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification.** 185. ed. [s.i]: Springer Science & Business Media, 2013. 478 p.

SAMSOM; R. PITT, J. I., **INTEGRATION OF MODERN TAXONOMIC METHODS FOR *PENICILLIUM* AND *ASPERGILLUS* CLASSIFICATION.** Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. 524 p.
SONDERGAARD, Teis et al. Fast Screening of Antibacterial Compounds from *Fusarium*. **Toxins**, v. 8, n. 12, 29 nov. 2016.

TAKAHASHI, J. A. et al. Filamentous Fungi and Chemistry: Old Friends, New Allies. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.2351-2382, 21 set. 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

VANDERMOLEN, K. M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **Amb Express**, v. 3, n. 1, p.3-71, 2013. Springer Nature.

Veerasingam T, Kalyanasundaram U, Suresh M, et al. **Antibacterial efficacy of *Penicillium chermesinum* TTMF3 isolated from marine soils of Andaman and Nicobar Islands, India.** Prog Biosci Bioeng, 2018.

VERRAES, Claire et al. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 10, n. 7, p.2643-2669, 28 jun. 2013.

VISAGIE, C.M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studied in Mycology**, v.78, p.343-371, jun. 2014. Elsevier BV.

YADAV, Ajar N. et al. Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. **New And Future Developments In Microbial Biotechnology And Bioengineering**, p.3-18, 2018.