

Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação

Production of bioactive compounds by *Aspergillus* kept under two preservation conditions

Fabiano Brito Prado¹, Waldireny Caldas Rocha¹, Salomão Rocha Martim¹, Mircella Marialva Alecrim¹, Larissa de Paiva Silva¹, Larissa Svetlana Cavalcante Silva¹, Taciana de Amorim Silva¹, Maria Francisca Simas Teixeira¹

¹Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil

Resumo: Com os objetivos de verificar a influência do método de preservação na atividade de metabólitos secundários e de selecionar espécies de *Aspergillus* como fontes de compostos com atividade antimicrobiana, foi feito um estudo com *Aspergillus* da coleção de culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA/UFAM). As linhagens foram reativadas e a sua viabilidade foi confirmada com base nas características morfológicas e nas estruturas de reprodução. A produção dos biocompostos foi feita em ágar extrato de levedura sacarose (*yeast extract sucrose* – YES). Os extratos orgânicos etanólico, acetato de etila e hexânico foram testados pelo método de difusão em ágar por poço contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os extratos que apresentaram antibiose neste teste foram analisados por bioautografia de imersão, sendo determinadas as concentrações mínimas inibitórias pelo método de microdiluição em caldo. O método de preservação em água destilada promoveu maiores estabilidade e pureza das culturas dos *Aspergillus*, independentemente do tempo de armazenamento, em comparação ao método de conservação em óleo mineral, sobretudo em relação ao fenômeno do pleomorfismo. Os dados aqui apresentados mostraram que, em condições *in vitro*, espécies de *Aspergillus* sintetizam compostos com atividade antibacteriana e antifúngica para inibir o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, preservados em água destilada, mesmo que por diferentes períodos.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Antimicrobiano. Difusão em ágar. Bioautografia. Extrato orgânico. Preservação.

Abstract: In order to verify the influence of the preservation method on the activity of secondary metabolites and to select species of *Aspergillus* as sources of compounds with antimicrobial activity, this study was made with *Aspergillus* from the DPUA collection of cultures. The strains were reactivated, and their viability was confirmed based on morphological characteristics and reproductive structures. The production of the biocompounds was made in YES agar. The ethanolic, ethyl acetate, and hexane organic extracts were tested by the agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The extracts that presented antibiosis in this test were analyzed by immersion bioautography and were determined at minimum inhibitory concentrations by broth microdilution method. The method of preservation in distilled water promoted greater stability and purity of the *Aspergillus* cultures, independent of storage time, compared to the method of preservation in mineral oil, especially in relation to the phenomenon of pleomorphism. The data presented here showed that *Aspergillus* species, although preserved for different periods under *in vitro* conditions, synthesize compounds with antibacterial and antifungal activity to inhibit the growth of *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*.

Keywords: *Aspergillus*. Antimicrobial. Agar diffusion. Bioautography. Organic extract. Preservation.

PRADO, F. B., W. C. ROCHA, S. R. MARTIM, M. M. ALECRIM, L. P. SILVA, L. S. C. SILVA, T. A. SILVA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 12(1): 37-47.

Autor para correspondência: Fabiano Brito Prado. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 – Coroado I. Manaus, AM, Brasil. CEP 69080-900 (fabiano.prado7@gmail.com).

Recebido em 14/02/2017

Aprovado em 27/06/2017

Responsabilidade editorial: Fernando da Silva Carvalho Filho



INTRODUÇÃO

Os fungos vêm sendo utilizados há anos devido às suas propriedades medicinais. Atualmente, uma variedade de compostos bioativos está disponível comercialmente como produtos farmacêuticos ou alimentícios, como os oriundos da penicilina, sintetizados por *Penicillium chrysogenum*, e o lentinano, polissacarídeo com ação antitumoral, isolado de *Shiitake*. Outros compostos bioativos produzidos por fungos incluem a ciclosporina, com ação antilinfocítica, e o ácido fusídico, agente anti-infeccioso utilizado no controle de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, resistente à metilina (Guimarães *et al.*, 2014; Iqbal *et al.*, 2015).

Na diversidade de fungos, espécies de *Aspergillus* destacam-se por sintetizar diversos compostos bioativos, entre os quais já foram identificados os antimicrobianos. *Aspergillus terreus* é fonte de lovastatina, um agente redutor de colesterol (Jahromi *et al.*, 2012). Também pode-se citar como exemplos a asperlicina, a equinocandina B e a fumagilina de *A. alliaceus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus*, que são usados como antifúngico, inibidor da angiogênese e antiparasitário, respectivamente (Bracarense & Takahashi, 2014).

Encontrar novas moléculas que possuem componentes bioativos de fontes naturais é algo de grande interesse e constitui uma alternativa contra micro-organismos patogênicos. Neste contexto, os compostos bioativos com atividade antimicrobiana sintetizados por fungos estão ganhando importância em aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (Sathi *et al.*, 2015).

Aspergillus são deuteromicetos que têm distribuição mundial, isolados de diversos substratos orgânicos, sendo que muitas espécies são oportunistas e causam patologias, tanto para humanos como para outros animais. Muitas espécies, no entanto, apresentam importância biotecnológica, sendo úteis na indústria de alimentos, na produção de detergentes e também no melhoramento ambiental e na área da saúde (Chen *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2015).

As coleções de cultura de micro-organismos constituem patrimônio de alta significação, representando herança científica e cultural de informações biológicas, com papel fundamental no estudo e na conservação dos recursos genéticos microbianos. A preservação de cultivos viáveis, puros e geneticamente estáveis, é requisito imprescindível em todo método de conservação para assegurar a reprodutibilidade das pesquisas microbiológicas básicas e aplicadas (Andreu *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2016). Considerando a importância industrial dos fungos anamórficos, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência dos métodos de preservação na síntese de compostos antimicrobianos por espécies de *Aspergillus*.

MATERIAL E MÉTODOS

MICRO-ORGANISMOS

Nesta pesquisa, foram avaliados dez representantes do gênero *Aspergillus*, sendo quatro espécies pertencentes ao grupo Niger, com seis linhagens (*Aspergillus niger* DPUA 398, *A. niger* DPUA 399, *A. pulverulentus* DPUA 478, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 613, *A. awamori* DPUA 1473) e uma espécie do grupo Flavus, com quatro linhagens (*Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451, *A. pulverulentus* DPUA 1455, *A. flavo furcatis* DPUA 1461 e *A. flavo furcatis* DPUA 1465), preservadas em óleo mineral e água destilada esterilizada. Os *Aspergillus* foram cedidos pela coleção de culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA/UFAM).

VIABILIDADE DAS ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS*

A confirmação da viabilidade dos *Aspergillus* foi realizada nos cultivados ágar Czapek + extrato de levedura (CYA), em tubos de ensaio com 130 mm x 15 mm. As culturas foram mantidas a 25 °C durante sete dias. Para confirmação da viabilidade das espécies, foram observadas as características macromorfológicas e as estruturas de reprodução (Raper & Fennel, 1977; Klich & Pitt, 1988).

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS

Na determinação da atividade antimicrobiana, as espécies de *Aspergillus* foram cultivadas em ágar extrato de levedura sacarose (*yeast extrat sucrose* – YES), em placa de Petri com 90 mm x 10 mm. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por 12 dias (Klich & Pitt, 1988; Samson *et al.*, 1995). Para extração dos biocompostos, foram retirados discos miceliais de seis milímetros de diâmetro da área central de cada cultura, quantitativo equivalente a duas gramas. Esse volume de massa micelial foi transferido para frascos de vidro com tampa rosqueável, contendo os seguintes solventes orgânicos: hexano, acetato de etila e etanol 95% (v/v). Os frascos foram mantidos a 25 °C, em estado estacionário. Após 48 horas, a massa micelial foi separada do sobrenadante, em membrana polietersulfônica (0,22 µm), e foram concentrados em rotaevaporador. Para determinação da atividade antimicrobiana, 200 µg de cada extrato foram dissolvidas em uma mistura contendo 500 µL do respectivo solvente extrator e 500 µL de solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v) (Silva, 2008).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MEIO SÓLIDO

Os extratos foram analisados frente a três micro-organismos teste, *Candida albicans* DPUA 1706, *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 e *Escherichia coli* CBAM 001. A levedura foi cultivada em ágar Sabouraud a 25 °C por 48 horas, e as bactérias, em ágar Mueller-Hinton, a 37 °C por 24 horas. Em cada cultura, foi preparada suspensão celular equivalente a escala 1 de McFarland. Como controles positivos, foram utilizados Itraconazol e Cloranfenicol (200 µg/mL) para levedura e bactérias, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2011). De cada suspensão celular, 200 µL foram semeados na superfície de ágar Sabouraud ou de ágar Mueller Hinton, em placas de Petri (90 mm x 10 mm), formando uma camada uniforme. Em cada poço, foram inoculados 100 µL dos extratos orgânicos e dos controles. As placas foram mantidas a

37 °C por 48 horas (levedura) e por 24 horas (bactérias). A atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros, medindo-se a área translúcida ao redor do poço.

BIOAUTOGRAFIA

Os extratos orgânicos foram diluídos em cada solvente de extração (900 µL em hexano, acetato de etila e etanol 95% (v/v) e 100 µL em solução aquosa de DMSO 10% (v/v)). Os controles e os extratos orgânicos, em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol), foram aplicados em placa de cromatografia em camada delgada (CCD), em sílica gel 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄, suporte em alumínio com espessura de 0,2 mm, medindo 5 cm x 10 cm (Merck/Alemanha). A eluição foi feita em cuba cromatográfica utilizando o sistema acetato de etila/éter de petróleo (6:4 v/v). Para manter o ambiente saturado no interior do recipiente, foi utilizado papel filtro (15 cm x 15 cm). Ao término da eluição, as placas de CCD foram submetidas à secagem. A revelação dos metabólitos foi realizada por meio de uma lanterna de emissão de radiação ultravioleta, com luzes branca (normal) e ultravioleta (365 nm). Os fatores de retenção (*retention factor* - RF) foram determinados por visualização de bandas no cromatograma (Silva *et al.*, 2010).

Para determinação da atividade antimicrobiana, foi utilizado ágar Sabouraud ou ágar Mueller-Hinton (20 mL/40 °C), contendo revelador Cloreto de Trifeniltetrazolium 1,0 % (p/v) (500 µL) e suspensão celular de cada micro-organismo teste (500 µL). Essa formulação foi superposta no cromatograma, em placa de Petri (120 mm x 9 mm). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas (levedura) e por 24 horas (bactérias). A atividade antimicrobiana foi determinada por visualização da zona de inibição (Silva, 2008; Martins *et al.*, 2012).

DETERMINAÇÃO DA CMI

A concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo,

descrita no documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). O teste foi realizado em microplaca de 96 poços e, em cada poço, foram adicionados 100 μL de caldo Sabouraud, para levedura, e de caldo Müeller-Hinton, para bactérias. O controle negativo foi feito na coluna 1, composta por meio + extrato orgânico e, na coluna 2, foram adicionados 100 μL do extrato na concentração de 500 mg/mL de solução aquosa de DMSO 10% (v/v). A partir da coluna 2 foram feitas as diluições seriadas, transferindo 100 μL de meio + extrato até a coluna 11. As concentrações finais das suspensões celulares dos micro-organismos teste foram de 5×10^5 UFC/mL, para as bactérias, e de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, para levedura. Como controles positivos, foram utilizados Itraconazol e Cloranfenicol, na mesma concentração dos extratos orgânicos. As placas multipoços foram mantidas a 37 °C por 24 e 48 horas para bactérias e levedura, respectivamente. Após esse período, em todos os poços foram adicionados 10 μL de solução aquosa de Alamar Blue® 0,1% (p/v). A alteração da cor do revelador para vermelho ou azul indicou resistência ou sensibilidade, respectivamente. A CMI foi definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento microbiano em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Regasini *et al.*, 2010; Bona *et al.*, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o resultado da avaliação e da viabilidade das linhagens de *Aspergillus*, dos grupos *Flavus* e *Niger*, preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral por diferentes períodos de estocagem (2-23 anos). Com base nas características morfológicas das colônias, nas estruturas vegetativas e nas de reprodução, predominou a viabilidade das espécies preservadas em água. De forma transitória, o fenômeno do pleomorfismo foi observado em 2,5% e 7,5% das espécies de *Aspergillus* preservadas em água e óleo mineral, respectivamente. A contaminação por outros fungos filamentosos foi constatada em 2,5% tanto dos preservados em água quanto em óleo mineral.

Com base nos dados apresentados na Tabela 1, as alterações verificadas nas culturas foram independentes do tempo de preservação, contudo, no método de conservação em óleo mineral, a eficácia foi reduzida quando comparada ao da água destilada esterilizada, em relação à viabilidade e à autenticidade das culturas dos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Os resultados aqui apresentados estão em concordância com citações da literatura. Sola *et al.* (2012) testaram comparar vários métodos de conservação para averiguar qual técnica é a melhor em determinada condição do ambiente, com a finalidade de dar manutenção ao patrimônio de culturas.

Em outra investigação, quando fungos filamentosos foram avaliados, houve distinta variação da viabilidade, associada ao tempo de preservação dos fungos estocados por 2-21 anos em água destilada esterilizada (Borman *et al.*, 2006; Abreu & Tutunji, 2008).

Dos métodos de preservação comparados neste trabalho, o realizado em água destilada esterilizada proporciona alta taxa de viabilidade, pureza, além de assegurar a estabilidade dos fungos. Em contrapartida, no realizado em óleo, ocorre redução da atividade metabólica, bem como continuidade da oxigenação que pode viabilizar o crescimento e a variabilidade genética (Farinas & Barboza, 2012).

Considerando que não existe uma técnica padronizada para preservação da diversidade dos representantes do reino Fungi e de demais micro-organismos, a escolha do método está comumente vinculada à dependência da manutenção das propriedades fenotípicas, genotípicas, biotecnológicas e de virulência (Girão *et al.*, 2004; Botelho *et al.*, 2013). Panizo *et al.* (2005) recomendam que seja feito rigoroso controle da viabilidade dos micro-organismos preservados em água e óleo para que sejam mantidas suas características durante o período de armazenamento em coleções.

Silva *et al.* (2010) realizaram uma investigação de linhagens de fungos do gênero *Penicillium*, provenientes da coleção de culturas DPUA, onde foram feitos ensaios de atividade antimicrobiana utilizando a técnica do bloco

Tabela 1. Porcentagem da viabilidade de culturas de *Aspergillus* preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral por diferentes períodos de estocagem, quando cultivadas em ágar Czapek + extrato de levedura (CYA), a 25 °C/7 dias. Legendas: ¹ = grupo Níger; ² = grupo Flavus; * = contaminação no período da reativação; ** = pleomorfismo transitório.

| Espécies | Estocagem | Estocagem (anos) | Culturas de <i>Aspergillus</i> | | | |
|---|-------------|------------------|--------------------------------|----------------|----------------------|----------------|
| | | | Preservadas em água | | Preservadas sob óleo | |
| | | | Testado (%) | Recuperado (%) | Testado (%) | Recuperado (%) |
| <i>Aspergillus niger</i> DPUA 398 ¹ | 1993 | 23 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 |
| <i>A. niger</i> DPUA 399 ¹ | 2014 | 3 | 1/2,50 | 1/2,50** | 1/2,50 | 1/2,50** |
| <i>A. pulverulentus</i> DPUA 478 ¹ | 1993 | 23 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 542 ¹ | 2009 | 8 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 613 ¹ | 1993 | 23 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50* |
| <i>A. awamori</i> DPUA 1473 ¹ | 2015 | 2 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 ² | 2003 | 14 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1455 ² | 2003 | 14 | 1/2,50 | 1/2,50* | 1/2,50 | 1/2,50** |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1461 ² | 2009 | 8 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50** |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 ² | 2002 | 15 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 | 1/2,50 |
| | Total (n/%) | | 10/100 | 10 | 10/100 | 10 |

de gelose e de bioautografia de culturas preservadas em óleo mineral e em água destilada.

Neste estudo, também foi avaliada a eficácia das espécies de *Aspergillus* na produção de compostos extracelulares para determinar a atividade antimicrobiana frente a bactérias e à levedura do gênero *Candida*.

A Tabela 2 demonstra os três solventes orgânicos, em ordem decrescente de polaridade (etanol, acetato de etila e hexano), que são utilizados para extração dos biocompostos, e a atividade antimicrobiana dos extratos recuperados dos cultivos dos *Aspergillus*, preservados em água destilada esterilizada ou em óleo mineral. A atividade antimicrobiana entre esses *Aspergillus* foi diversa, duas espécies não se mostraram eficazes, assim como a inibição do crescimento dos micro-organismos teste foi observada em um ou três dos extratos avaliados, com diferença significativa entre as medidas dos halos, no teste de difusão em ágar.

Quando foram avaliados os extratos orgânicos dos fungos preservados em água destilada esterilizada frente aos micro-organismos teste, os biocompostos dos

extratos de *A. niger* DPUA 399, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 613 e *A. awamori* DPUA 1473 foram ativos exclusivamente contra as bactérias teste avaliadas nesta pesquisa. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi sensível aos extratos de *A. niger* DPUA 398, com exceção do extrato hexano do preservado em óleo mineral. *A. niger* DPUA 398 e *A. flavo furcatis* DPUA 1465 demonstraram o mesmo resultado.

Para os espécimes preservados em água, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 demonstraram sensibilidade aos extratos acetato de etila de *A. japonicus* DPUA 613, enquanto o extrato etanol de *A. awamori* DPUA 1473 evidenciou isso exclusivamente para *S. aureus*. Do total de extratos avaliados, os biocompostos do extrato etanólico de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451 foram os únicos que inibiram o crescimento de *Candida albicans* e, entre as bactérias, de *Staphylococcus aureus*. Nos testes de difusão em ágar por poço, os compostos de *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. flavo furcatis* DPUA 1461, *A. pulverulentus* DPUA 478 não inibiram o crescimento de nenhum dos três micro-organismos teste.

Os dados obtidos mostraram a seletividade da atividade antimicrobiana dos compostos das espécies de *Aspergillus* quando pareados aos micro-organismos teste. É provável que esses dados estejam relacionados ao método, às condições de extração dos compostos e também à forma como os fungos foram submetidos a crescimentos.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana por difusão em ágar de extratos orgânicos de *Aspergillus* preservados em água destilada esterilizada e sob óleo mineral. Legendas: ¹ = grupo Niger; ² = grupo Flavus; EO = extrato orgânico; Ac = acetato de etila; Et = etanol 95%; Hex = hexano; Ca = *Candida albicans* DPUA 1706; Ec = *Escherichia coli* CBAM 001; Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; ^{a,b,c} = teste de Tukey em comparação das médias (confiança de 95%); R = resistente (não houve desenvolvimento de halo de inibição); S = sensível (houve desenvolvimento de halo de inibição, em milímetros).

| Espécie | EO | Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos | | | | | |
|---|-----|---|----------------------|----------------------|--------------------------|----|----------------------|
| | | Preservados/água destilada | | | Preservados/óleo mineral | | |
| | | Ca | Ec | Sa | Ca | Ec | Sa |
| <i>A. niger</i> DPUA 398 ¹ | Ac | R | R | S(2,1 ^b) | R | R | S(2,0 ^b) |
| | Et | R | R | S(2,9 ^a) | R | R | S(2,1 ^b) |
| | Hex | R | R | S(1,5 ^c) | R | R | R |
| <i>A. niger</i> DPUA 399 ¹ | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | R | R | R | R | R | S(2,2 ^b) |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 542 ¹ | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | R | R | R | R | R | S(1,6 ^c) |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 613 ¹ | Ac | R | S(1,7 ^c) | S(1,8 ^c) | R | R | R |
| | Et | R | R | R | R | R | R |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. awamori</i> DPUA 1473 ¹ | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | R | R | S(2,4 ^b) | R | R | R |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 ² | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | S(3,2 ^a) | R | S(1,6 ^c) | R | R | R |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 ² | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | R | R | S(1,3 ^c) | R | R | R |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. pulverulentus</i> DPUA 478 ¹ | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | R | R | R | R | R | R |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1455 ¹ | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | R | R | R | R | R | R |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1461 ² | Ac | R | R | R | R | R | R |
| | Et | R | R | R | R | R | R |
| | Hex | R | R | R | R | R | R |

Bioautografia é um método que tem sido utilizado para a determinação dos efeitos de bioatividade de substâncias, após separação cromatográfica, a exemplo das características antimicrobianas. Esta técnica é eficiente e tem sido utilizada há mais de 60 anos para a identificação rápida de substâncias (Suleiman *et al.*, 2010; Botz, 2013; Józwiak *et al.*, 2016).

Neste estudo, a bioautografia por imersão em ágar foi o método utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana dos biocompostos dos extratos orgânicos das espécies de *Aspergillus*. Os resultados das quatro espécies deste gênero selecionadas no teste de difusão

em ágar por poço estão demonstrados na Tabela 3. O fator de retenção (Rf) dos compostos foi de 0,70 a 0,88, variando a coloração entre azul e verde.

Os extratos em hexano, acetato de etila e etanol de *Aspergillus japonicus* DPUA 613 e *A. awamori* 1473 inibiram o crescimento de *S. aureus* (Tabela 3). Para as demais espécies, somente os extratos em hexano e acetato de etila de *A. japonicus* DPUA 542, *A. niger* DPUA 399, *A. flavo furcatis* DPUA 1451, *A. flavo furcatis* DPUA 1465 foram ativos contra *S. aureus*. Da totalidade de extratos testados, *C. albicans* foi sensível apenas ao extrato em hexano de *A. flavo furcatis* DPUA 1451 (Tabela 3).

Tabela 3. Bioautografia de espécies de *Aspergillus* que apresentaram halos de inibição nos testes por difusão em ágar. Legendas: Hex = hexano; Ac = acetato de etila; Et = etanol 95%; Rf = retention factor; Ca = *Candida albicans* DPUA 1706; Ec = *Escherichia coli* CBAM 001; Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; R = resistente (não houve desenvolvimento de halo de inibição); S = sensível (houve desenvolvimento de halo de inibição).

| Espécie | Extratos orgânicos | Rf $\Lambda = 365 \text{ nm}$ | Atividade antimicrobiana | | |
|---|--------------------|----------------------------------|--------------------------|----|----|
| | | | Ca | Ec | Sa |
| <i>Aspergillus niger</i> DPUA 398 (água) | Hex | 0,78 (azul) | R | R | S |
| | Ac | 0,78 (verde) | R | R | R |
| | Et | 0,80 (azul) | R | R | R |
| <i>A. niger</i> DPUA 398 (óleo) | Hex | 0,76 (azul) | R | R | R |
| | Ac | 0,75 (azul) | R | R | S |
| | Et | 0,76 (azul) | R | R | S |
| <i>A. niger</i> DPUA 399 (óleo) | Hex | 0,71 (azul) | R | R | S |
| | Ac | 0,71 (verde) | R | R | S |
| | Et | 0,71 (azul) | R | R | R |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 542 (óleo) | Hex | 0,70 (azul) | R | R | S |
| | Ac | 0,72 (azul) | R | R | S |
| | Et | 0,73 (azul) | R | R | R |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 613 (água) | Hex | 0,74 (azul) | R | R | S |
| | Ac | 0,74 (azul) | R | R | S |
| | Et | 0,75 (verde) | R | R | S |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 (água) | Hex | 0,75 (azul) | S | R | S |
| | Ac | 0,76 (verde) | R | R | S |
| | Et | 0,88 (azul) | R | R | R |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 (água) | Hex | 0,74 (azul) | R | R | S |
| | Ac | 0,74 (azul) | R | R | S |
| | Et | 0,75 (azul) | R | R | R |
| <i>A. awamori</i> DPUA 1473 (água) | Hex | 0,80 (azul) | R | R | S |
| | Ac | 0,80 (verde) | R | R | S |
| | Et | 0,81 (verde) | R | R | S |

A atividade antimicrobiana determinada por bioautografia mostrou que os *Aspergillus* possuem esta propriedade, contudo estudos mais detalhados devem ser realizados para ampliar o quantitativo e revelar compostos ativos, detectados pelo método de difusão em ágar por poço. Apesar dessa condição, entre os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana, os bioautográficos revelaram diferentes compostos extracelulares com atividade frente a *S. aureus*, *E. coli* ou *C. albicans*. Os fungos são fontes de metabólitos, produtos naturais sintetizados por diferentes vias, muitas vezes após o crescimento ativo ter cessado, a exemplo dos metabólitos secundários, os quais são produzidos por espécies geneticamente distintas, cuja síntese pode sofrer influência das condições ambientais (temperatura, pH, luz e nutrientes) (Keller *et al.*, 2005; Flipphi *et al.*, 2009; Fox & Howlett, 2008; Specian *et al.*, 2014). Flipphi *et al.* (2009) fizeram a filogenia e a evolução do metabolismo de carbono em espécies de *Aspergillus*. Keller *et al.* (2005) revisaram o porquê de algumas espécies produzirem diferentes perfis de metabólitos secundários. Fox & Howlett (2008) descreveram o papel dos metabólitos secundários na biologia fúngica. Specian *et al.* (2014) revisaram a importância dos fungos endofíticos na produção de metabólitos secundários em uso potencial para a fabricação de novas drogas.

A Tabela 4 demonstra a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pela técnica de microdiluição em caldo. A CMI determina a menor quantidade do composto bioativo capaz de inibir o crescimento microbiano em condições padronizadas (Oliveira *et al.*, 2009). A determinação dela pela técnica de microdiluição tem se demonstrado favorável, devido à sensibilidade e à quantidade mínima de reagentes, fatores que proporcionam maior número de replicações e aumento da confiabilidade dos dados (Ostrosky *et al.*, 2008).

Os resultados da CMI identificados para as espécies selecionadas por bioautografia revelaram que os extratos orgânicos de baixa e média polaridade foram os de maior eficiência na atividade antimicrobiana para *S. aureus*, entre os quais teve evidência o acetato de etila, com CMI 15,62. Nas condições de análise desta investigação, para os extratos avaliados, a CMI variou de 15,62 a 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, frente aos micro-organismos examinados. Nessa análise, *E. coli* e *C. albicans* foram os mais resistentes; apenas o extrato etanólico de *A. flavo furcatis* DPUA 1451, preservado em água, foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, com CMI equivalente a 15,62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Ainda que inexista uma padronização para a CMI de produtos naturais, dados da literatura revelam que a CMI inferior a 1 mg/mL pode ser considerada como ótima quando comparada a antibiótico padrão (Juiz *et al.*, 2016).

Tabela 4. CMI dos extratos de *Aspergillus* contra os micro-organismos teste (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*).

| Espécies/Método de preservação | Extratos orgânicos | Micro-organismo teste | CMI ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) |
|---|----------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>A. niger</i> DPUA 398 (água) | Hexano | <i>Staphylococcus aureus</i> | 31,25 |
| <i>A. niger</i> DPUA 398 (óleo) | Etanol 95% | <i>Staphylococcus aureus</i> | 250 |
| <i>A. niger</i> DPUA 399 (óleo) | Acetato de etila | <i>Staphylococcus aureus</i> | 125 |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 542 (óleo) | Acetato de etila | <i>Staphylococcus aureus</i> | 125 |
| <i>A. japonicus</i> DPUA 613 (água) | Acetato de etila | <i>Staphylococcus aureus</i> | 250 |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451 (água) | Acetato de etila Hexano | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> | 15,62 |
| <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1465 (água) | Acetato de etila | <i>Staphylococcus aureus</i> | 250 |
| <i>A. awamori</i> DPUA 1473 (água) | Etanol 95% | <i>Staphylococcus aureus</i> | 125 |

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa nos conduziram às seguintes conclusões:

1. O método de preservação em água destilada promoveu maiores estabilidade e pureza das culturas dos *Aspergillus*, independente do tempo de armazenamento, em comparação ao método de conservação em óleo mineral, sobretudo em relação ao fenômeno do pleomorfismo;
2. A atividade antimicrobiana por difusão em ágar mostrou a eficácia predominante dos biocompostos dos *Aspergillus* frente a *S. aureus*. O crescimento de *E. coli* e de *C. albicans* foi inibido apenas por extratos orgânicos obtidos de *A. japonicus* DPUA 613 e de *A. flavo furcatis* DPUA 1451, respectivamente;
3. Os testes de bioautografia mostraram a ação de diversos compostos sintetizados pelos variados *Aspergillus* com atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e confirmaram *A. flavo furcatis* DPUA 1451 como fonte de antifúngico para inibir o crescimento de *C. albicans*;
4. Com base nos valores de CMI relativa aos extratos avaliados, os compostos de *A. flavo furcatis* DPUA 1451 apresentam potencial antibacteriano frente a *S. aureus* e antifúngico em relação a *C. albicans*.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio técnico, científico e financeiro.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V. & V. L. TUTUNJI, 2008. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde* 2(2): 236-251. DOI: <http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v2i2.535>.

ANDREU, C. C. M. F., L. A. D. SUÁREZ, M. T. I. ZARAGOZÍ, C. A. LÓPEZ, G. M. MACHÍN, M. R. P. L. LANCHA & I. R. GUTIÉRREZ, 2013. Conservación de cultivos de hongos de importância médica em água destilada. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 65(3): 361-369.

BONA, E. A. M., F. G. S. PINTO, T. K. FRUET, T. C. M. JORGE & A. C. MOURA, 2014. Comparação de métodos para avaliação e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico* 81(3): 218-225. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001192012>.

BORMAN, A. M., A. SZEKELY, C. K. CAMPBELL & E. M. JOHNSON, 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 161(6): 361-368. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0023-z>.

BOTELHO, D. M. S., M. L. V. RESENDE, P. M. R. JÚNIOR, F. R. A. PATRÍCIO, E. A. PEREIRA, C. A. CARVALHO, S. A. MARTINS & M. B. S. JÚNIOR, 2013. Avaliação de dois métodos de preservação de *Cercospora coffeicola*. *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil* 8: 1-4.

BOTZ, L., 2013. Bioassays/Bioautography. In: J. REEDIJK (Ed.): *Elsevier reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering*: 1: 1-10. Elsevier, Waltham.

BRACARENSE, A. A. P. & J. A. TAKAHASHI, 2014. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(1): 313-321.

CHEN, Y., W. MAO, H. TAO, W. ZHU, X. QI, Y. CHEN, H. LI, C. ZHAO, Y. YANG, Y. HOU, C. WANG & N. LI, 2011. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresource Technology* 102(17): 8179-8184. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.048>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved Standard – Third Edition. CLSI M27A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

COELHO, M. P. S. L. V., R. F. C. FILHO, T. A. SILVA, A. R. G. MACHADO, M. M. ALECRIM, L. S. C. SILVA & M. F. S. TEIXEIRA, 2016. Inovação socioacadêmica na Amazônia. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM) (Ed.): *As coleções biológicas da UFAM, como informação estratégica para o ensino e conservação das espécies da biodiversidade Amazônica*: 179-187. EDUA, Manaus.

FARINAS, C. S. & D. C. BARBOZA, 2012. Fungos filamentosos de interesse em agroenergia: avaliação de diferentes metodologias de preservação do fungo *Aspergillus niger*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 37: 1-17.



- FLIPPPI, M., J. SUN, X. ROBLET, L. KARAFFA, E. FEKETE & A. P. ZENG, 2009. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. **Fungal Genetics and Biology** 46(supl. 1): 19-44.
- FOX, E. M. & B. J. HOWLETT, 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology** 11(6): 481-487. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.007>.
- GIRÃO, M. D., M. R. PRADO, R. S. N. BRILHANTE, R. A. CORDEIRO, A. J. MONTEIRO, J. J. C. SIDRIM & M. F. G. ROCHA, 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37(3): 229-233. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000300007>.
- GUIMARÃES, L. C., A. P. FERNANDES, S. M. CHALFOUN & L. R. BATISTA, 2014. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** 45(1): 43-47. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86822004000300007>.
- IQBAL, Z., S. I. KHAN, M. NUMAN, S. JAN, M. IQBAL, Z. DIN, Z. ALAM, S. S. ALAM & SAIFULLAH, 2015. Phytotoxic, cytotoxic and antimicrobial effect of the organic extract of *Aspergillus niger*. **International Journal of Biosciences** 6(10): 90-96.
- JAHROMI, M. F., J. B. LIANG, Y. W. HO, R. MOHAMAD, Y. M. GOH & P. SHOKRYAZDAN, 2012. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. **Journal of Biomedicine & Biotechnology** 2012: 196264. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/196264>.
- JÓZWIAK, G. W., B. M. DZIEDZIC, W. JESIONEK, W. ZIELINSKI & M. WAKSMUNDSKA-HAJNOS, 2016. Thin-layer chromatography: direct bioautography as a method of examination of antimicrobial activity of selected *Potentilla* species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** 39(5-6): 281-285. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2016.1163466>.
- JUIZ, P. J. L., M. J. A. CAMPOS, A. P. T. UETANABARO, R. J. C. ALVES & A. M. LUCCHESI, 2016. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* sobre periodontopatógenos. **Brazilian Journal of Periodontology** 26(4): 7-14.
- KELLER, N. P., G. TURNER & J. W. BENNETT, 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews. Microbiology** 3(12): 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1286>.
- KLICH, M. A. & J. I. PITT, 1988. **A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs**: 1-115. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, Australia.
- MARTINS, M. S., M. F. S. TEIXEIRA, J. C. SILVA, L. S. KIRSCH, O. C. C. FERNANDES, A. L. B. CARNEIRO, R. D. CONTI & N. DURÁN, 2012. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* - characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy** 6(3): 300-311.
- OLIVEIRA, T. F., J. S. FERREIRA, P. M. F. BOA SORTE, V. M. REIS, J. I. BALDANI & S. SCHWAB, 2009. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento** 49: 1-16.
- OSTROSKY, E. A., M. K. MIZUMOTO, M. E. L. LIMA, T. M. KANEKO, S. O. NISHIGAWA & B. R. FREITAS, 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(2): 301-307. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>.
- PANIZO, M. M., V. REVÁKINA, W. MONTES & G. GONZÁLEZ, 2005. Mantenimiento y preservación de hongos em agua destilada e aceite mineral. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología** 25(1): 35-40.
- RAPER, K. B. & D. I. FENNEL, 1977. **The genus *Aspergillus***: 1-686. Robert E. Krieger Co., Huntington.
- REGASINI, L. O., M. PIVATTO, L. SCORZONI, T. BENADUCCI, A. M. FUSCO-ALMEIDA, M. J. S. M. GIANNINI, E. J. BARREIRO, D. H. S. SIVA & V. S. BOLZANI, 2010. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20(5): 706-711. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000017>.
- SAMSON, R. A., E. S. HOEKSTRA, J. C. FRISVAD & O. FILTENBORG, 1995. Introduction to food-borne fungi. In: R. A. SAMSON, E. S. HOEKSTRA & J. C. FRISVAD (Ed.): **Identification of the common food-borne fungi**: 3-235. Central Bureau Voor Schimmelcultures, Wageningen.
- SATHI, Z. S., M. RAHMAN, M. A. RAHMAN, A. FARUK & M. A. RASHID, 2015. Antimicrobial susceptibility assesment of compound from *Aspergillus fumigatus*. **African Journal of Biotechnology** 14(3): 167-170. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2014.13829>.
- SILVA, J. C., 2008. **Perfil da viabilidade celular e atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* do acervo da coleção de culturas DPUA**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- SILVA, J. C., O. C. C. FERNANDES, M. S. MARTINS, A. C. RODRIGUES & M. F. S. TEIXEIRA, 2010. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia** 30(1): 48-54.
- SOLA, M. C., A. P. OLIVEIRA, J. C. FEISTEL & C. S. M. REZENDE, 2012. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Centro Científico Conhecer** 8(14): 1398-1418.
- SPECIAN, V., R. C. ORLANDELLI, A. C. FELBER, J. C. AZEVEDO & J. A. PAMPHILE, 2014. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **Journal of Health Sciences** 16(4): 345-351. DOI: <http://dx.doi.org/10.17921/2447-8938.2014v16n4p%25p>.

SULEIMAN, M. M., L. J. MCGAW, V. NAIDOO & J. N. ELOFF, 2010. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. **African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines** 7(1): 64-78.

TEIXEIRA, M. F. S., T. A. SILVA, R. A. PALHETA, A. L. B. CARNEIRO & H. M. ATAYDE, 2011. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)** 1-255. Editora da Universidade Federal do Amazonas, Manaus.



