



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE**  
**CIÊNCIAS DA VIDA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO *IN***  
***VITRO* DE EXTRATOS PRODUZIDOS POR FUNGOS EM CULTIVOS**  
**SUBMERSOS – UMA ABORDAGEM FRENTE A LEVEDURAS E BACTÉRIAS**  
**DE INTERESSE BIOMÉDICO E ALIMENTAR**

**LILIANE POLETO**

**CAXIAS DO SUL**

**2019**

LILIANE POLETO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO *IN*  
*VITRO* DE EXTRATOS PRODUZIDOS POR FUNGOS EM CULTIVOS  
SUBMERSOS – UMA ABORDAGEM FRENTE A LEVEDURAS E BACTÉRIAS  
DE INTERESSE BIOMÉDICO E ALIMENTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós –graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando a obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Marli Camassola (UCS)

Co- Orientadoras: Dra. Suelen Paesi (UCS)

Dra. Ceci Sales-Campos (INPA)

CAXIAS DO SUL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

P765c Poletto, Liliâne

Caracterização química e potencial antimicrobiano *in vitro* de extratos produzidos por fungos em cultivos submersos – uma abordagem frente a leveduras e bactérias de interesse biomédico e alimentar / Liliâne Poletto. – 2019.

132 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Suelen Osmarina Paesi, Ceci Sales-Campos.

1. Química vegetal. 2. Testes microbiológicos. 3. Fitoquímicos. 4. Fungos - Testes. I. Camassola, Marli, orient. II. Paesi, Suelen Osmarina, coorient. III. Sales-Campos, Ceci, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 547.9:582.28

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

**LILIANE POLETO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE EXTRATOS  
PRODUZIDOS POR FUNGOS EM CULTIVOS SUBMERSOS  
– UMA ABORDAGEM FRENTE A LEVEDURAS E  
BACTÉRIAS DE INTERESSE BIOMÉDICO E ALIMENTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando à obtenção do título  
de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Co-orientador: Profa. Dra. Suelen Paesi

Profa. Dra. Ceci Sales-Campos

TESE APROVADA EM 30 DE AGOSTO DE 2019

Orientadora

Profa. Dra. Marli Camassola

Co-orientador

Profa. Dra. Suelen Paesi

Dra. Ceci Sales-Campos

Profa. Dra. Lucélia Santi

Profa. Dra. Maria Lúcia Scroferneker

Profa. Dra. Ana Paula Delamare

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais que ensinaram-me que o conhecimento é o melhor  
caminho para alcançar os objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente às minhas orientadoras professoras Dra. Marli Camassola, Dra. Suelen Paesi e Dra. Ceci Sales-Campos pela confiança, paciência, carinho e dedicação durante todo o período de orientação. Aos colegas do Laboratório de Diagnóstico Molecular e do Laboratório de Enzimas e Biomassa, em especial à Dra. Roselei Claudete Fontana, pela paciência e dedicação nos ensaios; minha colega e grande amiga Ma. Letícia Osório da Rosa, responsável pela coleta dos fungos e companheirismo durante o período de doutorado. Agradeço a participação da equipe do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (UFRGS), na pessoa do professor Dr. Eliseu Rodrigues, pela grande paciência em ensinar a metodologia de HPLC/MS, além da orientação para análises destes resultados. Também um agradecimento especial ao professor Dr. Guilherme Baldo e a Ma. Édina Poletto, que aceitaram prontamente nosso pedido de colaboração para os ensaios de MTT.

Um agradecimento especial à minha família, principalmente ao meu esposo Eduardo por entender e apoiar minhas escolhas. Aproveito para agradecer a Universidade de Caxias do Sul / Instituto de Biotecnologia pela disponibilidade do espaço e apoio necessário para a realização deste projeto; à banca de acompanhamento professoras Dra. Ana Paula Delamare e Dra. Eloane Malvessi e à banca de avaliação pela disponibilidade e tempo em ler este trabalho e sugerir alterações para sua melhoria.

A todos meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 HISTÓRICO SOBRE ANTIMICROBIANOS.....	17
2.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA .....	21
2.3 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES EM ALIMENTOS .....	22
2.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTAs) .....	22
2.5 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS DE INTERESSE BIOMÉDICO .....	24
2.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS DE INTERESSE BIOMÉDICO E ALIMENTAR.....	25
2.6.1 Microrganismos Gram-negativos.....	25
2.6.2 Microrganismos Gram-positivos.....	29
2.6.3 Leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	30
2.7 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS.....	31
2.7.1 Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários fúngicos .....	33
2.8 METABOLÔMICA .....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
Capítulo 1 – Manuscrito 1 .....	42
Capítulo 2 – Manuscrito 2 .....	62
Capítulo 3 – Manuscrito 3 .....	84
4. DISCUSSÃO GERAL .....	104
5. CONCLUSÃO .....	106
6. PERSPECTIVAS .....	107
7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	108
Anexos.....	122





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Metabólitos secundários produzidos por fungos de importância econômica na indústria farmacêutica.....	32
<b>Tabela 2.</b> Fungos que apresentam atividade antimicrobiana e microrganismos sensibilizados.....	35
<b>Tabela 3.</b> Compostos fúngicos com atividade antimicrobiana e seu método de identificação.....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Linha do tempo da descoberta dos principais antibióticos. ....	18
<b>Figura 2.</b> Histórico da descoberta dos principais antifúngicos. ....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- DAD-UV/VIS:** espectrofotometria ultravioleta-visível com arranjo de diodos
- DTAs:** doenças transmitidas por alimentos
- EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC:** *E. coli* enteroinvasiva
- EPEC:** *E. coli* enteropatogênica
- ETEC:** *E.coli enterotoxigênica*
- EUA:** Estados Unidos da América
- GLASS:** *Global Antimicrobial Surveillance System*
- HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência
- HPLC-DAD-ESI-MS:** cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
- HRGC:** cromatografia gasosa de alta resolução
- HRMS:** espectrometria de massas de alta resolução
- IFT:** *Institute of Food Technologist*
- KPC:** *Klebsiela pneumoniae* resistente a antibióticos
- LC:** cromatografia líquida
- MAPA:** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MTT:** Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil )-2,5-difenil-2H-tetrazólio -
- NMR:** ressonância magnética nuclear
- OECD:** organização de países para cooperação e desenvolvimento econômico.
- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- PABA:** ácido paraminobenzóico
- UHPLC:** cromatografia líquida de ultra eficiência
- UPLC-Q/TOF-MS:** cromatografia líquida de desempenho ultra-quadrupolo com espectrometria de massas
- UTI:** unidade de terapia intensiva

## RESUMO

O aumento dos casos de resistência microbiana, ocorrida principalmente nos últimos 20 anos, juntamente com a redução no lançamento de novos antibióticos alertam a uma era pós-antibiótica eminente. Os fungos são fontes de metabólitos secundários com propriedades bioativas, inclusive propriedades antimicrobianas. Logo, é de fundamental importância o estudo dos metabólitos de fungos brasileiros para a avaliação de sua atividade antimicrobiana. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi selecionar, cultivar e identificar fungos isolados dos biomas Mata Atlântica e Amazônico com potencial antimicrobiano frente a leveduras e bactérias de interesse biomédico e alimentar, e, posteriormente realizar cultivos submersos para a produção de metabólitos que apresentem atividade contra os microrganismos avaliados. Após o *screening*, os fungos que apresentaram potencial antimicrobiano foram submetidos a cultivos submersos, tanto em frascos sob agitação (EF) como em biorreator (EB). Os caldos de cultivo foram filtrados, concentrados por liofilização e ressuspensos ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em água destilada estéril, para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana. Foram selecionados três fungos que apresentaram atividade antimicrobiana dentre os 134 fungos avaliados. Estes foram identificados como *Fusarium oxysporum*, *Cyclocybe cylindracea* e *Fomitopsis* sp. Os compostos presentes nos extratos preparados com os metabólitos de *F. oxysporum*, demonstraram ação antimicrobiana de amplo espectro com inibição entre 60% e 80%, dependendo do microrganismo alvo. Os compostos majoritários destes extratos foram identificados como ácido fusarinólico e seu isômero (56,9% EF e 59,2% EB), ácido desidrofusárico (35,7% EF e 31,6% EB) e ácido fusárico (6,5% EF e 1,1% EB). Para os extratos derivados de *C. cylindracea*, atividades antimicrobianas superiores ao controle amoxicilina foram observadas nos ensaios com *E. coli* OP50, enquanto para as leveduras a inibição foi similar ao fluconazol. Os compostos do extrato de *Fomitopsis* sp. inibiram o crescimento de todos os microrganismos testados e mostraram maior atividade antimicrobiana que o controle amoxicilina contra *Escherichia coli* OP50, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Acinetobacter baumannii*. Os compostos produzidos pelos macrofungos não puderam ser identificados devido a grande quantidade de metabólitos nas amostras e a limitação de informações sobre estas moléculas nos bancos de dados. Embora os extratos demonstraram amplo espectro de ação contra os microrganismos testados, também demonstraram efeitos tóxicos nas células humanas, em ensaios de MTT, nas maiores concentrações testadas. Os dados obtidos neste trabalho indicam o potencial dos metabólitos secundários, produzidos em cultivos submersos dos fungos *F. oxysporum*, *C. cylindracea* e *Fomitopsis* sp. visando o desenvolvimento de produtos que possam ser empregados na indústria alimentícia como conservantes alimentares alternativos, ou mesmo, que possam vir a ser estudados como fármacos.

## ABSTRACT

The increase in cases of microbial resistance, occurring mainly in the last 20 years, coupled with the reduction in the release of new antibiotics warn of an imminent post-antibiotic era.. In this context, the aim of this work was to select and identify isolated fungi of the Atlantic forest and Amazonian biomes that present antimicrobial potential against yeasts and bacteria of biomedical and alimentary interest, as well as to perform submerged cultures for production of metabolites that present antibiosis against the evaluated microorganisms. After the screening, fungi with antimicrobial potential were submitted to submerged cultures in both flasks (EF) and bioreactor (EB). The culture broths were filtered, concentrated by lyophilization and resuspended ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) in sterile distilled water, to carry out the antimicrobial activity tests. Three fungi were selected that showed antimicrobial activity among 134 evaluated fungi. These were identified as *Fusarium oxysporum*, *Cyclocybe cylindracea* and *Fomitopsis* sp. The extracts prepared with the metabolites of *F. oxysporum* demonstrated broad-spectrum antimicrobial action with inhibition between 60% and 80%, depending on the target microorganism. The majority compounds of these extracts were identified as fusarinolic acid and its isomer (56.9% EF and 59.2% EB), dehydrofusaric acid (35.7% EF and 31.6% EB), and fusaric acid (6.5% EF and 1.1% EB). For extracts derived from *C. cylindracea*, antimicrobial activities superior to the amoxicillin control were observed in the assays against *E. coli* OP50, while for yeast the inhibition was similar to fluconazole. *Fomitopsis* sp. extract inhibited the growth of all microorganisms tested and showed superior antimicrobial activity to amoxicillin control against *Escherichia coli* OP50, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Acinetobacter baumannii*. The compounds produced by macrofungi could not be identified due to the large amount of metabolites in the samples and the limitation of information about these molecules in the databases. Although the extracts showed broad spectrum of action against the tested microorganisms, they also demonstrated toxic effects on human cells in the highest concentrations tested. The data obtained in this work indicate the potential of submerged cultures of fungi *Fusarium oxysporum*, *Cyclocybe cylindracea* and *Fomitopsis* sp. for the generation of metabolites and extracts, aiming the development of products that may be used in the food industry as alternative food preservatives, or even that may be studied as drugs.

## 1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos constituem a forma de vida mais abundante do planeta, sendo a maioria benéfica ou incapaz de desencadear doenças e intoxicações. No entanto, há microrganismos potencialmente patogênicos para outros seres vivos. Para estes, representados principalmente por bactérias e fungos, muitas vezes, se faz necessário o controle da proliferação, a qual é realizada por meio da utilização de antimicrobianos. Todavia, os microrganismos têm se tornado cada vez mais resistentes aos antimicrobianos atualmente utilizados.

A preocupação com a resistência aos antibióticos aumentou ainda mais nos últimos vinte anos devido ao surgimento de linhagens multiresistentes. O aumento da resistência microbiana e a redução da disponibilidade de novos antibióticos levaram a uma era pós-antibiótica eminente. Neste contexto, os fungos são recursos alternativos para produzir novos compostos bioativos afim de controlar o desenvolvimento de microrganismos resistentes.

Os fungos são seres eucariontes e heterotróficos, representados por micro e macro-organismos, por possuírem formas micro e macroscópicas, respectivamente. Apresentam grande diversidade ecológica e de formas de nutrição, além de adaptarem-se em diferentes ambientes. Estes organismos desempenham um papel importante na decomposição de resíduos dos ecossistemas terrestres. Além disso, são capazes de produzir uma série de metabólitos secundários, e, assim, degradar uma ampla variedade de substratos.

Os metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados no meio de cultura durante o crescimento do microrganismo e que podem ser isolados e caracterizados para fins industriais. Entre os metabólitos secundários, destacam-se os agentes antimicrobianos, que auxiliam na sobrevivência de fungos nos ambientes. Portanto, a grande diversidade brasileira de fungos oferece fontes promissoras de compostos com propriedades antimicrobianas.

As doenças de veiculação alimentar representam problemas de ordem global, entre os microrganismos que são frequentemente identificados em contaminações alimentares no Brasil, estão *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*. Quando analisadas infecções nosocomiais, os microrganismos que estão frequentemente presentes são as espécies bacterianas *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, e as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017, inclui como o grupo mais crítico as bactérias multirresistentes, que são particularmente perigosas em hospitais, casas de repouso e entre os pacientes, cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores e cateteres intravenosos. Entre elas, estão *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias *Enterobacteriaceae* (incluindo *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Serratia* spp. e *Proteus* spp.). Estas bactérias podem causar infecções graves e frequentemente mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia. As consequências de infecções causadas por estas bactérias são responsáveis por 700 mil mortes todos os anos, podendo atingir 10 milhões até 2050 (OMS, 2017; Zaidi & Weier, 2019).

Adicionalmente, infecções por leveduras do gênero *Candida* são cada vez mais frequentes e representam um problema de ordem global. A crescente importância clínica atribuída às doenças causadas por fungos, aliada às dificuldades apresentadas pela administração de drogas antifúngicas como, por exemplo, o tempo prolongado do tratamento, alto custo dos medicamentos e a alta toxicidade causada pelos mesmos, vêm despertando interesse na busca de novas substâncias bioativas para o controle de micoses.

A busca por novos agentes antimicrobianos é de fundamental importância, uma vez que os microrganismos possuem alto potencial de recombinação genética, levando a um aumento de linhagens resistentes aos fármacos e antimicrobianos existentes.

Frente a diversidade brasileira de micro e macrofungos, é provável que sejam descritas novas fontes de antimicrobianos. Logo, torna-se necessário o estudo dos metabólitos dos fungos brasileiros para a avaliação da atividade antimicrobiana. Diante disto, o objetivo geral deste trabalho foi selecionar e identificar fungos isolados dos biomas Mata Atlântica e Amazônico, que apresentem em seu caldo de cultivo metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas frente a leveduras e bactérias de interesse biomédico e alimentar. Estas atividades visam ampliar os conhecimentos sobre as substâncias presentes, assim como contribuir para o desenvolvimento de extratos e/ou substâncias para a conservação de alimentos e/ou produção de antibióticos. Como forma de atingir o objetivo geral, este trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- selecionar por meio de *screening* fungos com potencial antimicrobiano sobre as bactérias e leveduras alvo;

- determinar o tempo e a forma de condução de cultivo, para produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas em cultivos submersos empregando os fungos selecionados na etapa de *screening*;
- avaliar a atividade antimicrobiana de extratos produzidos em cultivos submersos por fungos selecionados sobre as bactérias e leveduras alvo;
- identificar taxonomicamente, por meio de sequenciamento de DNA das regiões ITS1 e ITS4, os fungos que apresentaram atividade antimicrobiana;
- determinar a concentração inibitória mínima dos extratos fúngicos sobre as bactérias e leveduras alvo;
- identificar os metabólitos presentes nos extratos fúngicos;
- avaliar o potencial citotóxico dos extratos produzidos sobre células humanas HEK-293 (rim embrionário) e SH-SY5Y (neuroblastoma).



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

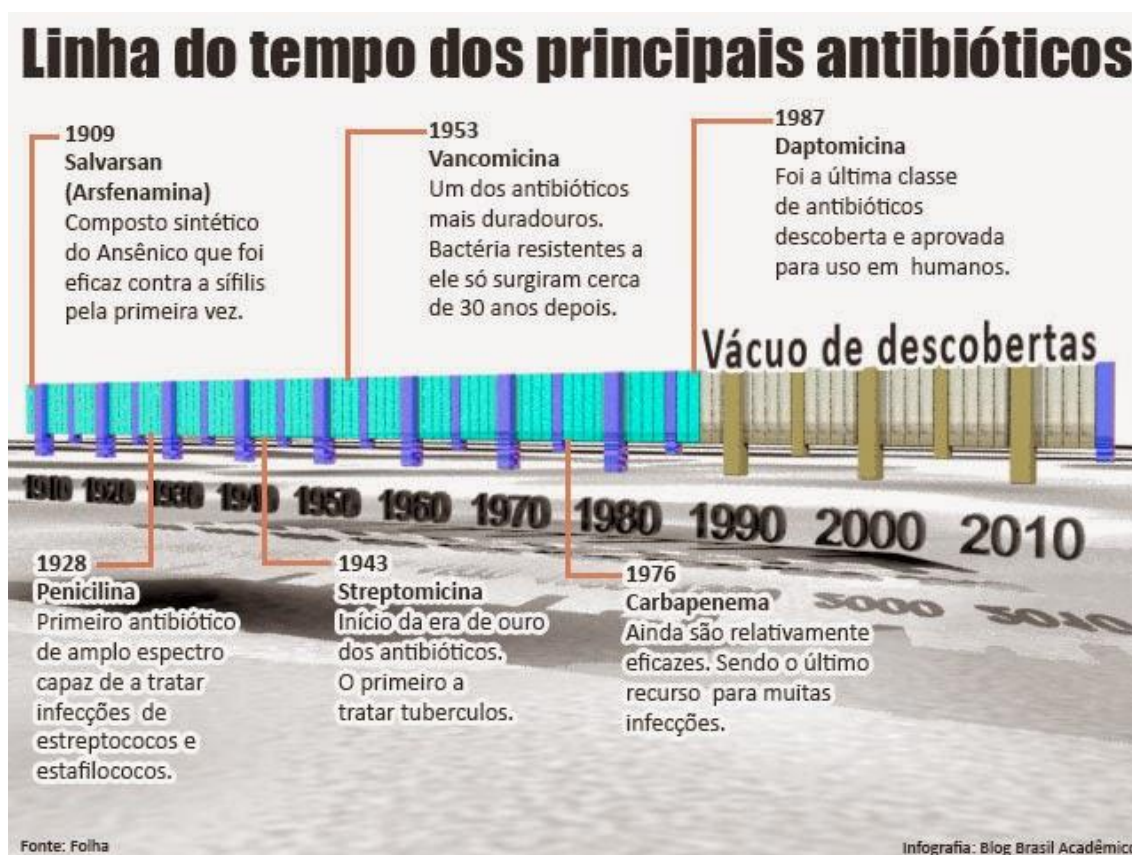
### 2.1 HISTÓRICO SOBRE ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são compostos que inibem o desenvolvimento de bactérias e fungos importantes para a saúde humana e animal (Grenni *et al.*, 2018). O antibiótico que se popularizou foi a penicilina, descoberta em 1928. Sua descoberta é atribuída a Alexander Fleming (Pereira & Pita, 2005; Yang *et al.*, 2018), mas o aprofundamento do estudo de suas propriedades foi realizado no ano de 1939, por Howard Florey e Ernest Chain (Pereira & Pita, 2005). No ano seguinte, 1940, a penicilina começou a ser comercializada com o uso restrito a militares. Apenas em 1944, ela se tornou disponível à população. Embora a penicilina seja até hoje um dos antibióticos mais vendidos, novos estudos sobre antimicrobianos tornaram-se necessários diante da problemática da resistência bacteriana, a fim de garantir a sobrevivência dos usuários (Alharbi *et al.*, 2014).

Ainda em 1944, Waksman e Schatz, isolaram a estreptomicina, sendo a primeira droga efetiva contra a tuberculose. Quatro anos depois, Waksman havia isolado a neomicina e outros 16 antibióticos (Bezerra *et al.*, 2017).

O grande avanço na pesquisa por antibióticos extraídos de fontes naturais ocorreu entre 1940 - 1960. Entre 1960 - 1980 foram introduzidos no mercado antibióticos semi-sintéticos. Entre 1980 - 2000 a principal ferramenta utilizada foi a genômica e a triagem de coleção de compostos; essas descobertas ocorreram concomitante com o aumento da incidência bacteriana. A partir dos anos 2000, poucos antibióticos chegaram ao mercado (Guimarães *et al.*, 2010). Atualmente, os antibióticos são classificados de acordo com sua estrutura química, modo de ação e microrganismo alvo. Bezerra *et al.* (2017) explicam que os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são capazes de inibir a síntese da parede celular. Bactérias Gram-negativas possuem menos sensibilidade a  $\beta$ -lactâmicos, devido a diminuição da permeabilidade celular causada pela complexidade de sua parede (Hubschwerlen, 2007). A bacitracina e a polimixina B alteram a permeabilidade celular, pela redução do número e tamanho das porinas (Hubschwerlen, 2007). Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica, tendo efeito se injetado, portanto seu uso fica restrito a ambientes hospitalares, comercialmente sua utilização se faz de forma tópica, principalmente em colírios. As quinolonas impedem a replicação do DNA, podendo

inclusive atingir o hospedeiro. A Figura 1 ilustra a linha do tempo da descoberta dos principais antibióticos.



**Figura 1.** Linha do tempo da descoberta dos principais antibióticos.  
 Fonte: <http://blog.brasilacademico.com/2015/01/primeira-classe-de-antibiotico.html>

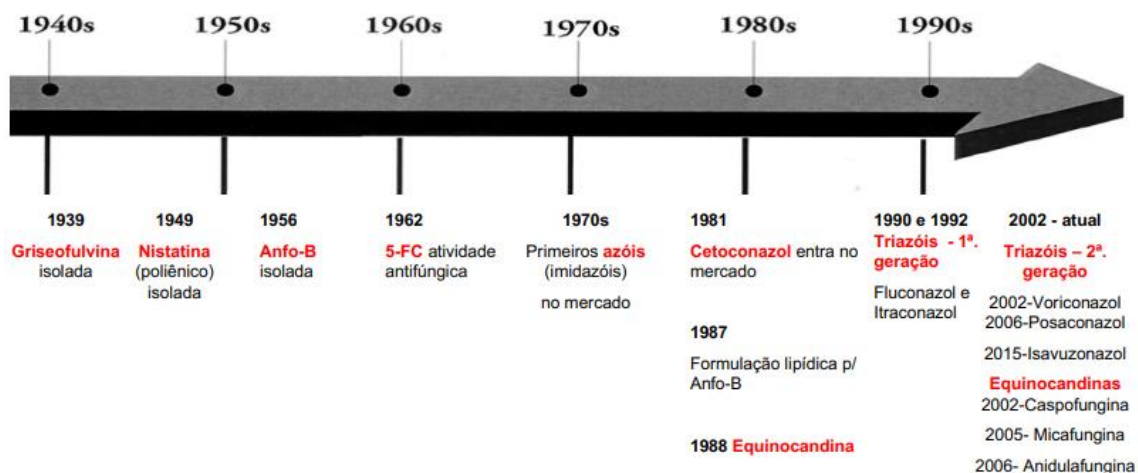
A produção anual de antibióticos gira em torno de 100.000 toneladas de antibióticos: penicilinas (60.000 toneladas), tetraciclina (5.500 toneladas), cefalosporinas (2.500 toneladas). Antibióticos naturais ou derivados de produtos naturais incluem antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como ampicilinas (5.000 toneladas), cefalexinas (4.000 toneladas), amoxicilina (16.000 toneladas), cefadroxilina (1.000 toneladas). Os macrolídeos compreendem azitromicina (1.500 toneladas), claritromicina (1.500 toneladas). Glicopeptídeos como, vancomicina e teicoplanina (9.000 toneladas). Dentre estes de 10-15% são produzidos por actinomicetos e 20% por fungos filamentosos (Silber *et al.*, 2016).

Pesquisas biotecnológicas de novos compostos antimicrobianos têm sido implementadas frente a problemática dos microrganismos resistentes. Ling *et al.* (2015) isolaram uma substância com o potencial antimicrobiano, a teixobactina, usando a ferramenta, o *iChip*, que foi usado para selecionar compostos de microrganismos

produtores de antibióticos com atividade contra *Staphylococcus aureus*. Estes autores mostraram que a teixobactina inibe a biossíntese de peptidoglicano em *S. aureus* por ligação a um sítio altamente conservado de lipídio II (um precursor do peptidoglicano) e lipídio III (um precursor do ácido teicoico). Modificações em estruturas moleculares do antibiótico têm sido propostas, visto que nenhuma nova classe de antibióticos com atividade contra bactérias Gram-negativas foi aprovada em mais de cinquenta anos. Smith *et al.* (2018) relataram a otimização química das arilomicinas - uma classe de produtos naturais com atividade fraca e espectro limitado - para obter G0775, uma molécula com atividade potente de amplo espectro contra bactérias Gram-negativas. G0775 inibe a peptidase bacteriana essencial do tipo I, um novo alvo antibiótico, através de um mecanismo molecular sem precedentes. Esta molécula contorna os mecanismos existentes de resistência a antibióticos e apresentou atividade contra isolados clínicos de Gram-negativos multirresistentes atuais em experimentos *in vitro* e em vários modelos de infecção *in vivo*.

Além da sua utilização no tratamento de infecções, os antibióticos são usados como antimicrobianos em cultivos celulares (animais, fúngicas e vegetais), promotores de crescimento animal ou no tratamento do câncer (Grenni *et al.*, 2018). Essa demasiada utilização tem aumentado a problemática da resistência microbiana.

Quanto aos antifúngicos, de acordo com Martinez (2006), as sulfonamidas começaram a ser usadas na década de 40, no tratamento de pacientes com micoses sistêmicas. Na década seguinte foi disponibilizada a anfotericina B. A 5-fluorocitosina, foi considerada como droga sinérgica da anfotericina B. O grupo das drogas azólicas teve seu uso clínico iniciado na década de 70. Nos anos 90, com maior biodisponibilidade e atividade, houve o lançamento dos triazólicos. Sendo recentemente liberado para uso médico o voriconazol. A Figura 2 descreve a linha do tempo da descoberta dos antifúngicos.



**Figura 2.** Histórico da descoberta dos principais antifúngicos.

Fonte: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4153295/mod\\_resource/content/1/Antif%C3%](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4153295/mod_resource/content/1/Antif%C3%B)

[BAngicos.pdf](#)

Assim como as infecções bacterianas, o número de doenças fúngicas aumentou significativamente nos últimos 20 anos, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Há registro de pelo menos 150 espécies de fungos associadas a doenças humanas, sendo a maioria delas relacionadas a infecções oportunistas. Encontram-se no mercado 14 antifúngicos para o tratamento de infecções sistêmicas, sendo os mais consumidos, anfotericina B, os azóis e as equinocandinas (Martinez, 2006; Espinel -Ingraff, 2014).

Anfotericina B atua como fungicida ligando-se ao ergosterol presente na membrana de fungos sensíveis, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos. As drogas azólicas são caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, o qual contém três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos). Consideradas drogas de uso sistêmico e efeito fungistático, o primeiro subgrupo compreende o miconazol e o cetoconazol e o último, o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Os azólicos atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica. Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos. Por último, as equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Três drogas - caspofungina, micafungina e anidulafungina - chegaram à fase de investigação clínica,

das quais a primeira está licenciada para uso clínico têm como alvo a parede celular, inibindo enzima ligada à síntese de beta (1.3) D- glucana (Martinez, 2006; Espinel - Ingrassia, 2014).

## 2.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA

A demanda por antimicrobianos cresceu, tendo seu consumo aumentado em torno de 36% nos últimos dez anos. Este aumento não está ligado apenas ao consumo humano como medicamento, mas ao seu uso agrícola, como forma de prevenir doenças nos rebanhos e aumentar a produção de alimentos (Yang *et al.*, 2018). O consumo mundial de antibióticos por humanos e na criação animal gira em torno de  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  toneladas/ano (Mehdi *et al.*, 2018). Essa quantidade de antibióticos se acumula ao longo das cadeias alimentares, aumentando a pressão seletiva e contribuindo diretamente para o aumento da resistência microbiana (Regiel-Futyra *et al.*, 2017; Mehdi *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

A resistência aos antibióticos é definida como a capacidade do microrganismo proliferar, mesmo na presença de antibióticos (Mehdi *et al.*, 2018). Trata-se de uma das maiores ameaças para a nossa sociedade e sistemas de saúde, já que o número de bactérias resistentes aos antibióticos está crescendo vertiginosamente (BRICs, 2018). O número estimado de pessoas mortas por infecções resistentes aos antibióticos a cada ano, em todo o mundo é de cerca de 700 mil, e acredita-se que chegará a 10 milhões em 2050 (Tanday, 2016; BRICs, 2018).

As bactérias podem manifestar resistência a drogas antimicrobianas através de vários mecanismos bioquímicos. Os principais mecanismos de resistência referem-se a alterações da permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos, como a redução da permeabilidade celular, combinado ao sistema da bomba de efluxo, o que diminui a concentração do antibiótico no espaço periplasmático, além da produção de  $\beta$ -lactamases que digerem o anel  $\beta$ -lactâmico principal problema das penicilinas (Hubschwerlen, 2007; Regiel-Futyra *et al.*, 2014). Ainda pode ocorrer resistência por mutações e aquisições de genes ou modificação de alvo (Mehdi *et al.*, 2018). Além da modificação de receptores celulares através da ação de enzimas, ativação de genes sob estresse e formação de biofilmes, impedindo a penetração do antimicrobiano na matriz e selecionando os microrganismos mais resistentes (Kumar *et al.*, 2019). As bactérias podem adquirir resistência por mutação do DNA do hospedeiro ou por aquisição de um DNA exógeno: transformação, transdução e tradução, que pode ocorrer entre

microrganismos da mesma espécie ou de espécies diferentes (Bezerra et al., 2017). A resistência pode resultar em propriedades intrínsecas, atingindo todos os membros do gênero; ou adaptativas, resultando em um novo fenótipo para o microrganismo (Bezerra et al., 2017).

### **2.3 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES EM ALIMENTOS**

Conservar o alimento, reduzindo e controlando a concentração e o crescimento de microrganismos, é fundamental para evitar a sua deterioração e garantir a segurança alimentar. Os microrganismos deteriorantes de alimentos causam alterações químicas prejudiciais, como cor, odor, sabor e aspectos físicos do alimento. Todas essas alterações são resultado das reações metabólicas dos microrganismos. Os alimentos podem ser contaminados por estes microrganismos em diferentes etapas como no plantio, colheita, manipulação, processamento ou preparo. Dentre os principais microrganismos deteriorantes de alimentos, destacam-se: *Pseudomonas* spp., *Schewanella putrefaciens*, *Brochotrix thermosphacta*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Yersinia enterocolitica* (Rukchon et al., 2014; Karthikeyan et al., 2015; Pothakos et al., 2015).

Os tipos de deterioração variam de acordo com a condição atmosférica que envolve os produtos e com a temperatura de armazenamento (Alcantara et al., 2012). A capacidade de crescimento e de sobrevivência dos microrganismos não depende só das características físicas e nutricionais do alimento, como também de um conjunto de fatores extrínsecos e intrínsecos ao próprio alimento, tais como: temperatura, pH, atividade de água e potencial redox, cada um dos quais pode ser manipulado convenientemente, de modo a impedir a contaminação e o crescimento de microrganismos (Nascimento et al., 2007; Jongenburger et al., 2012; Karthikeyan et al., 2015).

Estima-se que 20% dos alimentos do mundo são desperdiçados por deterioração, totalizando um prejuízo de US\$ 680 bilhões para países industrializados e US\$ 310 bilhões para países em desenvolvimento (Luo et al., 2014; FAO, 2018). O desafio da indústria alimentícia é desenvolver um alimento que contenha o mínimo possível de aditivos químicos, mas que mantenha o alimento livre de contaminações.

### **2.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTAs)**

As síndromes, resultantes da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos são conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos

(DTA). As DTAs são todas atribuídas à ingestão do alimento contaminado por microrganismos ou por suas toxinas. Podem atingir, além do sistema gastrointestinal, outros órgãos como as meninges ou sistema nervoso (Almeida *et al.*, 2013). Não constituem apenas um problema de saúde pública, mas causam também grandes prejuízos econômicos à sociedade. Segundo o *Institute of Food Technologists (IFT Status Summary)* (2004), 60% dos casos de DTA causados por bactérias requerem hospitalização. No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), durante o ano de 2017 foram notificados 557 surtos de DTAs, expondo 46.524 pessoas, sendo que 9.065 desenvolveram a doença e nove vieram a óbito. A maior parte das notificações de DTAs são feitas pelas regiões Sudeste e Sul. Grande parte dos casos de infecções e intoxicações ocorre nas próprias residências, sendo *Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus* os principais agentes etiológicos (MAPA, 2018). As pessoas mais vulneráveis a DTAs são idosos, gestantes, crianças e pessoas imunodeprimidas.

As DTAs podem se manifestar na forma de infecção, intoxicação ou toxinfecção. Para que ocorra a infecção é necessária a presença no alimento da bactéria patogênica em um número que represente a dose mínima infectante, que é definida como o número de células microbianas viáveis capazes de produzir a manifestação clínica da doença. As intoxicações ocorrem quando a toxina produzida pelo microrganismo se encontra no alimento ingerido. As toxinfecções decorrem da ingestão do alimento contendo o microrganismo que é capaz de produzir ou liberar toxinas após serem ingeridos (OPAS, 2001; Almeida *et al.*, 2013).

Existem mais de 200 agentes microbianos que podem estar associados a DTAs. Alguns desses vivem no intestino de animais, outros são naturais do solo, ou ainda estão presentes na água contaminada (Newell *et al.*, 2010). As bactérias são os principais microrganismos responsáveis por surtos de DTAs, com prevalência de *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *C. botulinum*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio cholera* (IFT Status Summary, 2004; Almeida *et al.*, 2013).

Entre os microrganismos que são frequentemente encontrados em contaminações alimentares no Brasil, estão *Salmonella* sp. (14,4%), seguido pelo *S. aureus* (7,7%), *E. coli* (6,5%) e *B. cereus* (3,1%) (Lentz *et al.*, 2018). Todavia, no Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, *B. cereus* representou 32% das intoxicações alimentares diagnosticadas entre 2003 e 2013 (Lentz *et al.*, 2018).

É importante salientar que alguns desses patógenos são capazes de sobreviver e proliferar em condições adversas, como por exemplo, sob refrigeração ou atmosfera

reduzida de oxigênio (IFT Status Summary, 2004). A maioria das DTAs são causadas por má conservação dos alimentos ou falta de boas práticas na sua manipulação. A prevenção da contaminação alimentar deve começar com boas práticas agrícolas, passando pelos mercados e prateleiras até chegar aos manipuladores de alimentos.

Estima-se que o número de microrganismos patogênicos relacionados a DTAs cresça ainda mais, devido ao rápido crescimento populacional, aumento do mercado global de alimento, aumento na procura por refeições preparadas, facilidade em viajar, mudanças de hábitos alimentares, alterações climáticas, aumento da população imunodeprimida (Newell *et al.*, 2010).

## 2.5 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS DE INTERESSE BIOMÉDICO

Frente a problemática com as infecções bacterianas (Hu *et al.*, 2018), a antibioticoterapia tornou-se um dos tratamentos mais importantes, sendo um dos pilares da medicina (Friedman *et al.*, 2016). No entanto, seu uso indiscriminado tem levado à resistência microbiana. Dados do *Global Antimicrobial Surveillance* (GLASS) afirmam que em 2018, houve a ocorrência de 500 mil casos de pessoas com suspeita de resistência a antibiótico, em 22 países. Portanto, a questão da resistência tornou-se um problema social, econômico e de saúde pública. A OMS considera a resistência microbiana um problema de saúde pública, uma vez que elevam-se os gastos com a saúde, bem como os casos de mortalidade (Sampaio *et al.*, 2018). Para países participantes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), como por exemplo, Austrália, Espanha e EUA; a estimativa é que os hospitais gastem entre US\$ 10.000 a 40.000 a mais no tratamento de pacientes com infecções multirresistente (Friedman *et al.*, 2016). Até 2050, estima-se que o gasto de cada um desses países com infecções multirresistentes possa chegar a US\$ 2,9 trilhões, tendo um impacto global na economia de 100 trilhões de dólares (Friedman *et al.*, 2016; ANVISA, 2017).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de bactérias multirresistentes que estão se tornando uma ameaça mortal recorrente em todo o mundo, e para o qual o desenvolvimento de novos antibióticos deve ser uma prioridade. A lista inclui como o grupo mais crítico as bactérias multirresistentes, que são particularmente perigosas em hospitais, casas de repouso e entre os pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores e cateteres intravenosos. Entre elas, estão *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias *Enterobacteriaceae* (incluindo *Klebsiella*, *E. coli*, *Enterococcus*, *Serratia* e *Proteus*). De acordo com esta lista, as bactérias que mais



apresentam resistência são: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Salmonella* spp. e entre as leveduras destacam-se as do gênero *Candida*. Já entre microrganismos que são frequentemente encontrados em infecções, estão as espécies bacterianas *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. faecalis* e leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Adicionalmente, infecções por leveduras do gênero *Candida* são cada vez mais frequentes e representam um problema de ordem global. De 2006 a 2010, em estudo realizado em um hospital brasileiro, na cidade de Campinas, verificou-se que entre as infecções levedurianas, destacaram-se leveduras do gênero *Candida*, sendo que *C. albicans* causou 44% dos episódios gerais, seguida por *C. tropicalis* (21,7%), *C. parapsilosis* (14,4%), *C. glabrata* (11,2%) e *C. krusei* (3,5%) (Moretti *et al.*, 2013). A crescente importância clínica atribuída às doenças causadas por fungos, aliada às dificuldades apresentadas pela administração de drogas antifúngicas como, por exemplo, o tempo prolongado do tratamento, alto custo dos medicamentos e a alta toxicidade causada pelos mesmos, vêm despertando interesse na busca de novas substâncias bioativas para o controle de micoses.

## **2.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS DE INTERESSE BIOMÉDICO E ALIMENTAR**

A seguir estão relacionados alguns dos principais microrganismos de interesse biomédico e alimentar que foram utilizados neste trabalho.

### **2.6.1 Microrganismos Gram-negativos**

#### **2.6.1.1 *Escherichia coli***

*E. coli* é uma bactéria responsável por diversos tipos de infecção. As bactérias deste gênero responsáveis por causar infecção intestinal são divididas de acordo com suas toxinas e formas de ação: enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC) e enteroinvasora (EIEC) (Carvalho *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013).

Conhecida popularmente como a diarreia do viajante, a intoxicação causada por *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), é responsável por diarreia aguda devido a fixação da bactéria e produção de toxinas na mucosa intestinal. Já *E. coli* EPEC causa diarreia geralmente em crianças e bebês menores de 3 anos. Os sintomas da intoxicação por EPEC são diarreia aquosa com muco, vômito e febre, havendo colonização da mucosa intestinal e produção de lesões características de ligação ou desaparecimento de bordas celulares.

*E. coli* EHEC pode causar diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica. É responsável por produzir a toxina *Shiga – like* ou VTEC, produtora da toxina verotoxina. Por último, a EIEC coloniza o cólon, sendo responsável por sintomas como arrepios, febre, fezes com sangue, dores abdominais e de cabeça (Carvalho *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2018). Algumas linhagens de *E. coli* também estão relacionadas a infecções urinárias (Lima *et al.*, 2016a).

#### **2.6.1.2 *Salmonella* spp.**

Trata-se de um microrganismo capaz de colonizar qualquer tipo de animal, especialmente o trato reprodutor das aves (Newell *et al.*, 2010). A transmissão de *Salmonella* spp. para o homem ocorre geralmente pelo consumo de alimentos não processados e de origem animal, que estejam contaminados (Oliveira *et al.*, 2013). Segundo *IFT Scientific Status Summary* (2004), os principais alimentos associados a surtos de salmonelose são ovos e leite cru. O período de incubação é de 12 a 36 horas. Os sintomas são febre alta, diarreia, vômitos e sepse (Carvalho *et al.*, 2007). Os sintomas duram de um a sete dias, mas os microrganismos podem ser excretados nas fezes durante alguns dias após os sintomas. Além da contaminação por ingestão do alimento contaminado, o homem se contamina por práticas impróprias com o alimento, como por exemplo, a má higienização das mãos, de ferramentas e de bancadas.

Embora o desenvolvimento da *Salmonella* esteja diretamente ligado à atividade água do alimento, esta bactéria pode viver longos períodos no alimento desidratado. De acordo com *IFT Scientific Status Summary* (2004), um método prático para controlar a *Salmonella* é o processamento térmico da amostra, uma vez que este microrganismo é sensível ao calor.

#### **2.6.1.3 *Pseudomonas aeruginosa***

O gênero é bastante conhecido pela grande variedade metabólica e pela capacidade de colonizar diversos nichos ecológicos (Chevalier *et al.*, 2017). Trata-se de um microrganismo comensal do corpo humano, é a principal causa de infecções hospitalares oportunistas (Wagner *et al.*, 2016). Segundo Lima *et al.* (2016B), *P. aeruginosa* é responsável por uma série de infecções, como por exemplo infecções de pele, do trato urinário, orelhas e olhos. Em pacientes portadores de fibrose cística é a principal causa de infecção, atingindo 80% dos pacientes. Devido ao surgimento de cepas multirresistentes, infecções por *P. aeruginosa* têm levado grande parte dos pacientes com fibrose cística a óbito (Hewer & Smyth, 2017).

A resistência de *P. aeruginosa* está na baixa permeabilidade da membrana, além do fato de serem formadoras de biofilme, uma estrutura de resistência ao sistema imune do paciente e aos antibióticos. A colonização costuma acontecer em locais de baixa imunidade, como por exemplo, cortes, traumas e próteses (Wagner *et al.*, 2016; Chevalier *et al.*, 2017).

#### **2.6.1.4 *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella* sp. pertence ao grupo dos coliformes, são bacilos entéricos e encapsulados (Gundogan, 2014). Segundo o autor anteriormente citado, são patógenos oportunistas, associados a infecções nosocomiais, pneumonia, sepse, meningite, infecções do trato urinário e do trato intestinal, causando diarreia pela liberação de sua enterotoxina.

*K. pneumoniae* tornou-se um grande problema de saúde pública, quando em 1996 foi identificada uma linhagem resistente, a KPC ou “super-bactéria”. A KPC é capaz de hidrolisar carbapenêmicos, o principal agente antimicrobiano da classe dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Campos *et al.*, 2016). A maioria das infecções ocorre em paciente imunodeprimidos. Estão presentes no ambiente e podem contaminar alimentos. É a segunda bactéria Gram-negativa com mais ocorrência em bacteremias no mundo (Podschun & Ullmann, 1998; Tominaga, 2018).

#### **2.6.1.5 *Acinetobacter baumannii***

As infecções estão associadas ao trato respiratório, urinário e ferimentos. Importante patógeno multirresistente, constantemente associada a surtos hospitalares. Responsável por infecções nosocomiais, principalmente em pacientes imunodeprimidos, infecções de tecidos moles, meningites e infecção urinária. Penetra no corpo principalmente por feridas abertas e uso de cateteres. Além disso, as infecções por *A. baumannii* estão associadas a longos períodos de internação hospitalar. A mais grave das infecções é a pneumonia, tendo uma expectativa de vida de oito dias após o diagnóstico. Estima-se que, no mundo ocorram 1 milhão de casos de infecção por *A. baumannii* anualmente (Antunes *et al.*, 2014).

Esta bactéria pode viver comensalmente em pelos e cabelos (AL-Kadmy *et al.*, 2018). Também está associada a infecções fatais em neonatos. Além da multirresistência a antibióticos, que parece estar associada ao uso de morfina, uma vez que este medicamento age como imunossupressor (Antunes *et al.*, 2014). O microrganismo é formador de biofilme, o que dificulta seu tratamento (Juma *et al.*, 2016). Estudos *in vitro* demonstram que células presentes em biofilmes tornaram-se 10 a 1.000 vezes mais

resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células planctônicas das mesmas linhagens (Shafahi & Vafai, 2010).

#### **2.6.1.6 *Proteus mirabilis***

São microrganismos putrefativos que habitam o intestino humano e animal (Hamilton *et al.*, 2018). Podem causar endocardites e pneumonia em pessoas imunodeprimidas. Trata-se de um microrganismo formador de biofilme, que costuma colonizar cateteres. *P. mirabilis* é um potencial agente patogênico para portadores da doença de *Crohn's*, além de um importante agente de infecções urinárias (Hamilton *et al.*, 2018), podendo associar-se a outras bactérias como: *P. aeruginosa*, *Providencia stuartii*, *K. pneumoniae* e *E. faecalis* (Norsworthy & Pearson, 2017).

Há vários fatores que contribuem para que microrganismos do gênero *Proteus* spp. sejam agentes de infecções gastrointestinais como mobilidade, aderência, produção de urease, hemólise, protease e a habilidade de adquirir resistência (Hamilton *et al.*, 2018). O dimorfismo entre células *swimming*, predominam em ambientes líquidos e dotadas de flagelo para a locomoção; e células *swarming*, tipo de diferenciação celular para ambientes viscosos ou sólidos; também são mecanismos adaptativos que garantem a sua sobrevivência do gênero (Hamilton *et al.*, 2018). Durante a fase *swarming* são produzidas as proteases microbianas, importantes fatores de virulência devido a ação direta sobre as proteínas do hospedeiro, particularmente as imunoglobulinas (Michelin, 2008).

Dentre os fatores de virulência têm-se destaque a produção de urease, utilizada para metabolizar a ureia em dióxido de carbono e amônia, utilizada como fonte de nitrogênio no metabolismo microbiano (Hamilton *et al.*, 2018). Essa produção de amônia eleva o pH da urina e promove a sedimentação de cristais de cálcio e fosfato de magnésio, o que contribui para a formação de um biofilme cristalino e cálculos renais (Norsworthy & Pearson, 2017; Fonseca *et al.*, 2018). O biofilme cristalino garante a sobrevivência do microrganismo no trato urinário, protegendo-o dos antibióticos e da resposta do sistema imune. Além disso, o biofilme formado pode bloquear o fluxo de urina através do cateter resultando em complicações, até mesmo sepse (Fusco *et al.*, 2017). O gênero *Proteus* spp. tem também por característica a produção de metaloproteases que fazem a digestão proteolítica de IgA e IgG, além de outros componentes celulares para garantir sua sobrevivência no trato gastrointestinal e urinário (Hamilton *et al.*, 2018).

## 2.6.2 Microrganismos Gram-positivos

### 2.6.2.1 *Staphylococcus aureus*

A contaminação do alimento ocorre pela manipulação do mesmo por indivíduos infectados, muitas vezes assintomáticos, ou pela mastite. Trata-se de uma das infecções alimentares mais frequentes. É decorrente da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado pela bactéria, frequentemente veiculadas ao consumo de leite e seus derivados (Oliveira *et al.*, 2013). Os sintomas podem aparecer entre 30 min a 8 horas após o consumo da toxina na comida (*IFT Scientific Status Summary*, 2004). O paciente contaminado por *S. aureus* apresenta vômitos, diarreia, dores abdominais, sudorese e dores de cabeça. Os sintomas costumam passar após 48 horas (Carvalho *et al.*, 2007). Embora a célula de *S. aureus* seja sensível a altas temperaturas, a toxina é estável.

Clinicamente trata-se de um microrganismo comensal de pele e de glândulas, estima-se que pelo menos 20% das pessoas sejam portadoras assintomáticas de *S. aureus* (Lakhundi & Zhang, 2018). Trata-se de um importante agente patogênico humano, sendo sua capacidade de adaptação a diversas superfícies e ambientes, juntamente com o uso clínico de meticilina, os responsáveis pelo aparecimento de clones de *S. aureus* resistentes as penicilinas e a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos (Lakhundi & Zhang, 2018). As cepas resistentes a meticilina (MRSA) são responsáveis por 25 a 50% das infecções por *S. aureus* em ambientes hospitalares. Como consequência eleva-se a morbidade e a mortalidade dos pacientes (Lakhundi & Zhang, 2018).

### 2.6.2.2 *Bacillus cereus*

Vivem nos mais variados habitats, podendo viver desde o solo até o intestino de animais e de insetos (Arnensen *et al.*, 2008). São formadores de endósporos, o que permite sua sobrevivência em ambientes hostis. Produzem duas enterotoxinas diferentes, causando vômito ou diarreia (*IFT Scientific Status Summary*, 2004), sendo sua toxicidade variável conforme a linhagem (Arnensen *et al.*, 2008).

Os sintomas aparecem de 0,5 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado, sendo a duração da doença de 6 a 24 horas (Arnensen *et al.*, 2008; Forghani *et al.*, 2015).

A contaminação acontece através da ingestão de vegetais crus, carnes, pescado, leite, cereais e massas contaminados (Carvalho *et al.*, 2007). Muitas vezes, o tratamento a quente do alimento, não é suficiente, pois os esporos são resistentes a altas temperaturas (*IFT Scientific Status Summary*, 2004).

### 2.6.2.3 *Staphylococcus epidermidis*

Trata-se de uma bactéria comensal, prevalente na pele humana (Kleinschmidt *et al.*, 2015). Assim como a maioria dos microrganismos comensais, são responsáveis por infecções em pessoas imunocomprometidas. Para Vuong & Otto (2002) é o principal agente de infecções nosocomiais. A infecção sanguínea ocorre geralmente pela utilização de dispositivos e próteses percutâneas. Após a colonização da prótese, o microrganismo pode formar biofilme, permitindo sua sobrevivência no sistema imune do hospedeiro (Kleinschmidt *et al.*, 2015).

Diferentes isolados de *S. epidermidis* têm mostrado prevalência nas infecções de neonatos, que se contaminam logo após o nascimento, tendo seu quadro agravado pelos procedimentos invasivos da UTI, levando-os a sepse (Kleinschmidt *et al.*, 2015). Kleinschmidt *et al.* (2015) estimam que entre 70-85% das infecções por *S. epidermidis* demonstram resistência a antibióticos. O tratamento convencional é combinar vancomicina com outras drogas, que podem levar a nefrotoxicidade e ototoxicidade. Os autores ainda estimam que, nos EUA, o custo médio para tratar um neonato infectado gira em torno de US\$ 7.600,00. Portanto, torna-se necessários novos estudos para buscar novos fármacos para combater infecções por *S. epidermidis* que diminuam os custos e os efeitos colaterais do tratamento.

### 2.6.2.4 *Enterococcus faecalis*

Trata-se de uma bactéria comensal do trato digestório humano e animal (Campos *et al.*, 2013). São causadores de infecções invasivas e oportunistas como bacteremia, septicemia, infecções de feridas, meningites e endocardites (Ceci *et al.*, 2015). *E. faecalis* foi identificado como o terceiro patógeno responsável por infecções urinárias entre os pacientes de UTI (Hussain *et al.*, 2016).

As infecções graves causadas por *Enterococcus* são difíceis de tratar devido à capacidade do organismo sobreviver em ambientes hospitalares, a capacidade de adquirir mecanismos de resistência à antibióticos e a formação de biofilmes (Holmberg & Rasmussen, 2016; Strateva *et al.*, 2016). Poucos antimicrobianos são ativos contra espécies enterocócicas, pois possuem resistência intrínseca a vários agentes, como por exemplo à ampicilina e à vancomicina (Ceci *et al.*, 2015; Holmberg & Rasmussen, 2016).

### 2.6.3 Leveduras do gênero *Candida*

São conhecidas por serem patógenos oportunistas, tendo um aumento considerável nos casos de infecção nas últimas duas décadas (Santos *et al.*, 2018). O microrganismo pode causar infecção bucal, ocular, hepatosplênica, pulmonar, cardíaca,

músculo esquelética, sistema nervoso central, entre outras. As infecções atingem principalmente pessoas imunodeprimidas ou que utilizam dispositivos médicos invasivos (Millsop & Fazel, 2016).

A candidíase invasiva tem causado graves problemas de morbidade e mortalidade, ocupando o quarto lugar em infecções de corrente sanguínea no mundo (Bassetti *et al.*, 2016). A candidemia, presença de *Candida* na corrente sanguínea, é uma infecção tão grave que 10 a 40% dos casos é associado à sepse ou ao choque séptico (Santos *et al.*, 2018). *Candida albicans* é o principal microrganismo isolado em fungemias, seguida de *Candida paraosiloses* e *Candida tropicalis* (Sorendino *et al.*, 2017). Como no caso das bactérias, as leveduras pertencentes a este gênero também apresentam resistências aos medicamentos disponíveis no mercado. A resistência está associada, principalmente à exposição aos fármacos e pela capacidade de formação de biofilme. A formação de biofilme aumenta a sua resistência, capacidade de aderência e nível de patogenicidade dos microrganismos (Bassetti *et al.*, 2016; Millsap & Fazel, 2016; Sorendino *et al.*, 2017).

Pelo fato dos fungos possuírem células eucarióticas, o tratamento das infecções fúngicas fica limitado, pois atingem também as células humanas (Santos *et al.*, 2018). As drogas disponíveis para o tratamento de *Candida* spp., incluem os azóis, alilaminas, polienos. Os azóis atuam inibindo a atividade da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase responsável pela síntese de ergosterol, o que leva à acumulação de um esteroide tóxico (14- $\alpha$ -metil-3,6-diol) e a perda da integridade da membrana plasmática (Vieira *et al.*, 2017). Já os polienos ligam-se ao ergosterol e interferem nos poros transmembrana, o que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática provocando a morte celular por perda de componentes (Vieira *et al.*, 2017). As alilaminas inibem a enzima esqualeno epoxidase, tendo o efeito antifúngico devido o acúmulo de de esqualeno no citoplasma e falta de ergosterol nas membranas. Essas drogas podem ter três locais de ação, o retículo endoplasmático, a membrana celular ou ainda podem agir na síntese de ácidos nucleicos das leveduras. O fluconazol é o tratamento mais utilizado na maioria das infecções, principalmente devido ao seu menor custo. Diante da resistência das leveduras aos fármacos torna-se necessário que a Ciência desenvolva novos antimicóticos.

## **2.7 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS**

Os fungos são seres eucariotos heterotróficos classificados entre os micro e macro-organismos (Meyers *et al.*, 1989; Vanderline & Onofre, 2010). É difícil generalizar

características dos fungos devido à sua diversidade ecológica (Abreu *et al.*, 2015). Estes microrganismos desempenham importante papel na decomposição de resíduos dos ecossistemas terrestres (de Boer *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2015). Além disso, são capazes de produzir uma série de metabólitos secundários devido a sua capacidade de degradação de uma ampla quantidade de substratos (de Boer *et al.*, 2005; Zerikly & Challis, 2009; Khan *et al.*, 2014). Os metabólitos são compostos secretados no meio de cultivo durante o crescimento do microrganismo e que pode ser isolado e caracterizado para fins industriais. Alguns destes metabólitos secundários são fontes potenciais para produtos farmacêuticos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013), como representado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Metabólitos secundários produzidos por fungos de importância econômica na indústria farmacêutica.

Metabólito	Fungo	Aplicação
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Nectria lucido</i>	Antibacteriano
Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aspergillus</i> sp.	Antibacteriano
Glandicolina B60	<i>Penicillium</i> sp.	Antimicrobiano
Grafislactona	<i>Cefalosporium</i> sp.	Antioxidante
Aspermigerina	<i>Aspergillus niger</i>	Tratamento de carcinoma nasofaríngeo e cervical
Vincristina	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tratamento de leucemia em crianças

\*Fonte: Papaguani (2004), Sánchez-Fernández *et al.*, (2013), Khan *et al.*, (2014).

Dentre as classes de fungos, destacam-se os macrofungos (Classe Basidiomycetes), conhecidos vulgarmente como cogumelos, que possuem estrutura de reprodução podendo ser hipógeos ou epígeos, sendo estes grandes e possíveis de serem vistos a olho nu (Chang, 2008). Cogumelos silvestres são importantes fontes de nutrientes e compostos bioativos, sendo frequentemente utilizados na alimentação (Putzke & Putze, 2004; Yaltirak *et al.*, 2009; Heleno *et al.*, 2015).

Devido as suas propriedades antioxidante, antitumorais, antivirais e antimicrobianas, os macrofungos têm aplicação na indústria (produção de enzimas) e na produção de fármacos (antimicrobianos) (Lallawmsanga *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2017),



tais características elevam seu valor econômico (Mattila *et al.*, 2000; Yaltirak *et al.*, 2009; Esposito & Azevedo, 2010; Arango & Nieto, 2013; Gyawali & Albrahim, 2014; Chowdhury *et al.*, 2015; Smolskaitė *et al.*, 2015). As espécies comestíveis possuem alto valor proteico, baixa quantidade de calorias, vitaminas, minerais, fibras, baixos níveis de sódio e antioxidantes, os quais ajudam a combater doenças coronárias, diabetes, distúrbios neurológicos, artrite e câncer, tornando-os alimentos funcionais (Yaltirak *et al.*, 2009; Chowdhury *et al.*, 2015; Heleno *et al.*, 2015; Reis & Rocha, 2015; Smolskaitė *et al.*, 2015).

Componentes bioativos têm sido isolados a partir de cogumelos, incluindo proteínas, polissacarídeos ou complexos de polissacarídeo-proteína. Esses componentes bioativos tornaram-se fontes naturais de agentes antioxidantes, antitumorais, antivirais e antimicrobianos (Suay *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2011; Aras *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Angamuthu *et al.*, 2019). Os compostos funcionais estão presentes tanto no micélio como no basídio, ou ainda podem estar no meio de fermentação, ou seja, podem ser extracelulares (Arango & Nieto, 2013; Chowdhury *et al.*, 2015). Dentre esses compostos, encontram-se substâncias fenólicas, polissacarídeos,  $\beta$ -glucanos, enzimas, ácidos graxos, polifenóis, terpenos, esteroides e flavonoides, este último possui atividade antioxidante (Suay *et al.*, 2000; Lakhanpal & Rana, 2005; Yaltirak *et al.*, 2009; Ashagrie *et al.*, 2014; Siu *et al.*, 2014; Chowdhury *et al.*, 2015). Dentre os compostos citados, os polissacarídeos e fenólicos são os compostos majoritários presentes nos cogumelos comestíveis (Ooi & Liu, 2000; Siu *et al.*, 2014). Estes compostos podem ser encontrados em diferentes concentrações de acordo com a parte do basidioma utilizado e o estágio de desenvolvimento do cogumelo (Reis & Rocha, 2015).

Com o aumento pela procura de produtos naturais, os macrofungos têm recebido considerável atenção em pesquisas na área de alimentos e produtos farmacêuticos. Muitas espécies têm sido utilizadas em medicamentos tradicionais chineses ou alimentos funcionais no Japão e outros países asiáticos (Reis & Rocha, 2015). Há um crescente interesse nos metabólitos secundários de cogumelos com a finalidade de desenvolver novos fármacos.

### **2.7.1 Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários fúngicos**

O uso dos fungos para tratar infecções é de conhecimento antigo, mas apresentou grande expansão na década de 40 devido ao impacto da penicilina. Embora a busca por novos antimicrobianos seja necessária no combate aos patógenos emergentes, poucos antimicrobianos têm chegado ao mercado nos últimos anos.

Os metabólitos secundários são produzidos em resposta ao estresse ambiental, como uma estratégia de sobrevivência dos fungos em seu hábitat (Carvalho *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2017). As fontes de nitrogênio e carbono, além do pH, são responsáveis pela regulação dos genes que comandam a produção dos metabólitos secundários (Sorensen & Sondergaard, 2014). Portanto, a composição dos metabólitos varia de acordo com a espécie fúngica e o substrato onde os fungos foram crescidos. Os metabólitos podem ser separados em grupos, os derivados de aminoácidos, policetídeos, peptídeos não ribossomais, derivados de ácidos graxos, alcaloides, isoprenoides e híbridos de policetídeos-peptídeos (Kempken & Rohefs, 2010; Khan *et al.* 2014). Estes compostos podem apresentar atividade farmacêutica, imunossupressora e tóxica (Khan *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos podem ser uma alternativa na busca de novos agentes antimicrobianos naturais. Actinomicetos (bactérias) e fungos filamentosos são a maior fonte de antimicrobianos naturais (Wu *et al.*, 2015). Estima-se que 78% dos antimicrobianos sejam produtos naturais, como por exemplo, penicilina, gentamicina, estreptomicina e clorafenicol (Kumar *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2014). A diversidade de fungos filamentosos e macrofungos oferecem grandes fontes de antimicrobianos naturais (Ren *et al.*, 2014), que por muitas vezes apresentam atividade antimicrobiana maior que muitos antibióticos e antifúngicos utilizados comercialmente (Helena *et al.*, 2015).

A busca crescente por alimentos naturais ou minimamente processados tem feito com que a utilização de antimicrobianos naturais em alimentos mereça destaque nos últimos anos (Calo *et al.*, 2015; O'Connor *et al.*, 2015). O crescente interesse por produtos naturais referem-se ao fato de apresentarem menos riscos à saúde, além de contribuir na busca de um alimento com maior prazo de validade e melhor qualidade (Belda- Galbis *et al.*, 2014; Gyawali & Albrahim, 2014). Várias pesquisas têm mostrado a atividade antimicrobiana de fungos, embora poucas revelem a sua importância na conservação de alimentos (Gyawali & Albrahim, 2014).

Na saúde pública, a resistência aos antibióticos tem se tornado uma preocupação constante. Diante da problemática da resistência aos antibióticos, os fungos podem fornecer novos compostos bioativos para combater o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Portanto, a grande diversidade brasileira de micro e macrofungos pode oferecer diferentes fontes de antimicrobianos (Lima *et al.*, 2016b). Alguns fungos e sua atividade antimicrobiana estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Fungos que apresentam atividade antimicrobiana e microrganismos sensibilizados.

<b>Fungo</b>	<b>Microrganismo alvo</b>	<b>Referência</b>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> <sup>a</sup>	<i>B. cereus</i>	Smânia <i>et al.</i> , 1998
<i>Pleurotus</i> sp. <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>	Wisbeck <i>et al.</i> , 2002
<i>Russula delica</i> <sup>a</sup>	<i>Candida albicans</i> <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. enteritidis</i> <i>Shigella sonnei</i>	Yaltirak <i>et al.</i> , 2009
<i>Pycnoporus sanguineus</i> <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>P. aeruginosa</i>	Vanderlinde & Onofre, 2010
<i>Pleurotus nebrodensis</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	Adebayo <i>et al.</i> , 2012
<i>Pleurotus eryngii</i> <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i>	Schillaci <i>et al.</i> , 2013
<i>Phoma</i> sp. <sup>b</sup>	<i>B. megaterium</i>	Hussain <i>et al.</i> , 2015A
<i>Fusarium</i> sp. <sup>b</sup>	<i>B. megaterium</i>	Hussain <i>et al.</i> , 2015B
<i>Grifola frondosa</i> <sup>a</sup>	<i>B. cereus</i>	Klaus <i>et al.</i> , 2015
<i>Curvularia pallescens</i> <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Nascimento <i>et al.</i> , 2015
<i>Tapinella atrotomentosa</i> <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> <i>A. baumannii</i> <i>E. coli</i>	Béni <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus versicolor</i> <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i> <i>Vibrio campbelli</i>	Wang <i>et al.</i> , 2018
<i>Pleurotus pulmonarius</i> <sup>a</sup>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>S. aureus</i>	Madhanraj <i>et al.</i> , 2019

<sup>a</sup>macrofungos; <sup>b</sup>fungos filamentosos

As primeiras investigações sobre a atividade antimicrobiana de basidimicetos foi realizada por Anchel *et al.* (1941) (Brizuela *et al.*, 1998; Sadven, 2000; Rosa *et al.*, 2003). Neste estudo, os autores isolaram e identificaram da pleuromutilina, um diterpeno utilizado para o tratamento de infecções por micoplasma em animais (Kavanagh *et al.*, 1950; Brizuela *et al.*, 1998; Suay *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2003). A partir do isolamento

da pleuromutilina foi desenvolvido o primeiro antibiótico comercial obtido de macrofungos.

A atividade antimicrobiana de cogumelos é atribuída a presença de vários compostos do metabolismo secundário, como por exemplo, compostos voláteis, alguns fenóis, ácido gálico e ácidos graxos livres. Os principais metabólitos secundários com atividade antimicrobiana isolados de macrofungos pertencem à classe poliacetileno, terpenóides e fenólicos (Alves *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2017).

Das 140.000 espécies de cogumelos que existem mundialmente, estima-se que menos de 10% seja estudada (Bal, 2018), sendo que a maioria dos estudos se referem a espécies comerciais. Assim, a pesquisa de espécies selvagens torna-se promissora, uma vez que a diversidade metabólica está diretamente relacionada à diversidade de espécies (Hawksworth, 1991; Rosa *et al.*, 2003; Rosenberger *et al.*, 2018). Embora o Brasil possua um grande potencial para estudo de compostos bioativos a partir de macrofungos, poucas espécies foram efetivamente testadas. Portanto é de suma importância que se estude a diversidade de compostos bioativos de cogumelos selvagens oriundos de ecossistemas tropicais, como o Brasil.

## 2.8 METABOLÔMICA

A metabolômica é a análise abrangente (qualitativa e quantitativa) dos metabólitos de um organismo ou sistema (Xu *et al.*, 2014). Este ramo da Ciência tem por objetivo a determinação dos metabólitos de uma dada amostra (metaboloma) identificando-os e caracterizando-os (German *et al.*, 2005). Trata-se de uma técnica analítica de alto rendimento utilizada para medir metabólitos de baixa massa molecular, permitindo a comparação simultânea de amostras biológicas diferentes (Wu *et al.*, 2015). No caso dos extratos oriundos dos fungos, é imprescindível fazer seu perfil metabólico para identificar seu potencial uso.

O processo de identificação dos metabólitos consiste em uma sequência de etapas: preparação da amostra, extração de metabólitos, derivatização, separação dos metabólitos, detecção e tratamento de dados. Nem sempre todas as etapas são necessárias, dependendo da amostra analisada (Cevalhos-Cevalhos *et al.*, 2009).

Para o mapeamento completo da constituição metabólica (*fingerprint*) é necessário o uso de múltiplas técnicas, já que pode-se chegar a milhares de compostos. Por isso, o acoplamento de uma técnica que leve à separação dos constituintes com uma ou mais técnicas espectroscópica é frequentemente utilizado. Dentre as técnicas de

separação, destacam-se: cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC), cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), sendo que as últimas duas técnicas são as mais utilizadas por ser compatível com qualquer tipo de analito. Já as técnicas espectrométricas: a espectrofotometria ultravioleta – visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis), a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e a ressonância magnética nuclear (NMR 1D e 2D) destacam-se para a obtenção de perfis metabólicos de amostras complexas (Warwick *et al.*, 2005; Roessner & Bownw, 2009; Funari *et al.*, 2013).

Quanto à técnica de HPLC, segundo Bonta (2017) é utilizada para análises quantitativas e qualitativas de compostos não voláteis, como por exemplo, fenólicos, terpenóides e alcaloides. Os resultados das amostras qualitativas são avaliados com base nos tempos de retenção dos padrões de referência. A estimativa quantitativa é feita com base na curva padrão gerada após a injeção do padrão em diferentes níveis de concentração.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica bem estabelecida com alta seletividade e sensibilidade, que permite a identificação dos compostos por meio de suas massas atômicas (Bedia *et al.*, 2018). As massas moleculares de grandes biomoléculas podem ser consideradas com uma precisão de 0,01% do total da amostra (Bonta, 2017). A análise de MS pode ser dividida em 3 etapas: ionização, análise de massas e detecção. Os padrões de fragmentação das massas são determinados principalmente por ionização de elétrons por pulverização (ESI) e por pressão atmosférica de ionização (APCI), sendo a análise por ESI no modo positivo e negativo, a mais indicada para a análise de metabólitos secundários (Bonta, 2017).

A aplicação de MS pode ser ampliada quando combinada com outras técnicas, como por exemplo, HPLC/MS. Para a análise do metaboloma microbiano, HPLC/MS tem sido a metodologia mais utilizada (Xu *et al.*, 2014). Trata-se de um método eficaz para a descoberta de novos antibióticos a partir do *fingerprint* microbiano (Wu *et al.*, 2015). Para a identificação de compostos fenólicos a técnica mais utilizada é HPLC-DAD-ESI-MS/MS (Yu *et al.*, 2009; Bonta, 2017). A Tabela 3 descreve alguns compostos antimicrobianos naturais identificados a partir de fungos, assim como a técnica utilizada na identificação destes compostos.

**Tabela 3.** Compostos fúngicos com atividade antimicrobiana e seu método de identificação.

Fungo	Metabólito antimicrobiano	Método de análise	Referência
<i>Gloeostereum incarnatum</i>	Sesquiterpenos, condrosterina e dicotiocromeno	NMR	Bunbamrung <i>et al.</i> , 2017
<i>Inonotus sanghuang</i>	Rutina, ácido clorogênico e quercitina	LC-MS	Liu <i>et al.</i> , 2017
<i>Penicillium commune</i> , <i>P. canescens</i> , <i>A. alternata</i>	3- metil-1-butanol - 1-octen-3-ol, Phenilethil, 3-metil-1- butanol, acetato B- cedren	GC-MS	Malhadas <i>et al.</i> , 2017
<i>Tapinella atrotomentosa</i>	Lactonas –osmudalactona, 5-hidroxi-hex-2-em-4-olide, terfenil quininas, espiromentinas C e B	HPLC-MS- NMR	Béni <i>et al.</i> , 2018
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Polissacarídeos	H- NMR	Chaiharn <i>et al.</i> , 2018
<i>Fusarium chlamydosporo</i>	Fusarithioamida B	NMR	Ibrahim <i>et al.</i> , 2018
<i>Craterellus cornicopioides</i>	$\beta$ -caroteno, licopeno, flavonoides, ácido gálico e p-cumarinas	HPLC	Kol <i>et al.</i> , 2018
<i>Talaromyces funiculosus</i> , <i>T. islandicus</i> , <i>T. minioluteus</i> , <i>T. pinophilus</i> , <i>P. janthinellum</i>	Ácido subero-hidroxâmico, Procainamida, Hidralazina	HPLC-UV visível	Lima <i>et al.</i> , 2018
<i>Mycena haematopus</i>	Mycenoflavina A, B, C e D; Pirroloquinona	NMR e HRMS/ ESI	Lohmann <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus versicolor</i>	Antraquinona, 2-(dimetoximetil)-1-hidroxi-antraceno-9,10-diona	Espectometria e NMR	Wang <i>et al.</i> , 2018
<i>Penicillium cataractum</i>	Penicimenolidyu A e B	NMR	Wu <i>et al.</i> , 2018
<i>Fomitopsis</i> sp.	Fomitopsins I e J	HPLC – NMR	Isaka <i>et al.</i> , 2019
<i>Cordyceps militaris</i>	Fenóis, flavonoides, ácido ascórbico, $\beta$ -carotenos e licopeno	Espectometria	Joshi <i>et al.</i> , 2019

A identificação dos compostos fúngicos é uma promissora área na tentativa de combater a resistência microbiana. A América do Sul, mais precisamente o Brasil, devido

ao seu clima quente e úmido, representa um reservatório de espécies, que ainda são pouco estudadas. Portanto, o estudo da biodiversidade fúngica bem como de seu metaboloma é uma área promissora na pesquisa biotecnológica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram avaliados quanto a propriedades antimicrobianas 134 isolados fúngicos, sendo, 108 provenientes do bioma Mata Atlântica (Torres - RS) e 26 do bioma Amazônico (Manaus - AM). Dentre os fungos analisados foram selecionados três isolados (1 micro e 1 macrofungo do RS, além de 1 macrofungo Amazônico), ou seja, aproximadamente de 2,5% das amostras analisadas demonstram potencial antimicrobiano sobre as bactérias e leveduras alvo. O número de amostras selecionadas, relaciona-se a metodologia utilizada no *screening*, uma vez que os fungos têm o crescimento lento se comparado ao crescimento bacteriano.

Os resultados são apresentados em três capítulos.

O primeiro capítulo é constituído pelo manuscrito intitulado “Antimicrobial efficacy against pathogenic bacteria and yeasts of extracts of *Fusarium oxysporum* PR-33 in submerged culture: alternative agents for the near future”. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários presentes no filtrado de cultura submerso de *F. oxysporum*, bem como identificar os principais compostos. Será submetido à revista *Mycotoxin Research*. Os dados obtidos neste trabalho também constituem um pedido de patente, a qual foi depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o número BR 102019005151-5, intitulado “Método de cultivo de *Fusarium oxysporum*, processo de obtenção de extrato de *Fusarium oxysporum* e seu uso”. Este documento está disponibilizado no anexo desta tese.

O segundo capítulo é constituído pelo manuscrito intitulado “*Cyclocybe cylindracea* as a producer of bioactive metabolites in submerged cultivation against pathogenic bacteria and yeasts”. O objetivo deste estudo foi avaliar a antibiose do caldo de cultivo contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, bem como leveduras do gênero *Candida*, além de verificar o potencial citotóxico dos metabólitos extracelulares presentes em culturas de *C. cylindracea*. Complementarmente, os principais compostos presentes no extrato obtido da cultura submersa de *C. cylindracea* foram identificados. Será submetido à revista *International Journal of Medicinal Mushrooms*.

O terceiro capítulo é constituído pelo manuscrito intitulado “Antimicrobial properties of extracts containing metabolites of Amazonian mushrooms grown by submerged cultivation”. O objetivo deste trabalho foi selecionar fungos coletados na Amazônia cujos extratos apresentaram potencial antimicrobiano contra microrganismos



patogênicos e contaminantes alimentos, bem como identificar seus metabólitos secundários e avaliar sua citotoxicidade. Será submetido à revista *Medical Mycology*.

## Capítulo 1 – Manuscrito 1

### **Antimicrobial efficacy against pathogenic bacteria and yeasts of extracts of *Fusarium oxysporum* PR-33 in submerged culture: alternative agents for the near future**

Liliane Poletto<sup>1,4</sup>, Letícia Osório da Rosa<sup>1</sup>, Roselei Claudete Fontana<sup>1</sup>, Eliseu Rodrigues<sup>2</sup>, Edina Poletto<sup>3</sup>, Guilherme Baldo<sup>3</sup>, Suelen Paesi<sup>4</sup>, Ceci Sales-Campos<sup>5</sup>, Marli Camassola<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Caxias do Sul - Institute of Biotechnology Laboratory of Enzymes and Biomass, Caxias do Sul - RS / Brazil 95070-560. Tel.: 55 54 3218-2149. E-mail: lpoletto@ucs.br; ticiaor@gmail.com; rfontana@ucs.br; mcamassola@gmail.com

<sup>2</sup> Federal University of Rio Grande do Sul - Institute of Food Science and Technology (ICTA), Porto Alegre - RS / Brazil 91501-970. Tel. : 55 51 3308-9786. E-mail: eliseu.rodrigues@ufrgs.br

<sup>3</sup> Federal University of Rio Grande do Sul - Gene Therapy Center -Hospital of Clinics of Porto Alegre, Porto Alegre – RS/ Brazil 90035-903. E-mail : edinapoletto@gmail.com; gbaldo@hcpa.edu.br

<sup>4</sup> University of Caxias do Sul - Institute of Biotechnology Laboratory Molecular Diagnostic, Caxias do Sul - RS / Brazil 95070-560. Tel.: 55 54 3218-2149. E-mail: sopaesi@ucs.br

<sup>5</sup> National Institute of Research of the Amazon (INPA), Manaus - AM / Brazil 69011-970. Tel: 55 92 3643-3082. Email: ceci@inpa.gov.br

#### **Abstract**

The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of the metabolites produced by *Fusarium oxysporum* PR-33 in submerged culture, in flasks (EF) and in bioreactor (EB) against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts. Metabolites were determined by *HPLC-DAD-MS/MS*. An extract was obtained following the removal of mycelium by centrifugation and lyophilisation of the supernatant. The compounds in this extract demonstrated broad-spectrum antimicrobial action, with rates of inhibition between 60% and 80%, depending on the species and extract tested. The major compounds of the extracts were identified as fusarinolic acid and its isomer (56.9% EF and 59.2% EB), dehydrofusaric acid (35.7% EF and 31.6% EB), and fusaric acid (6.5% EF and 1.1% EB). The extracts were cytotoxic in HEK-293 and SH-SY5Y cells. Therefore, our results indicate that the compounds identified exhibit potential as novel

drugs or antimicrobial agents, and that the method of extraction influences the production of metabolites.

**Keywords:** antibiotics; biopharmaceuticals; antimicrobial agents; antimicrobial resistance; screening test.

## 1. Introduction

Preoccupation with antibiotic resistance has increased significantly in the last twenty years due to the emergence of resistant strains. Increased microbial resistance and reduced availability of new antibiotics has led to an eminent post-antibiotic era [1 - 3]. In this context, fungi may provide novel bioactive compounds to combat the development of pathogenic microorganisms.

Fungi are able to produce a series of secondary metabolites and thus degrade a wide variety of substrates [4, 5]. Secondary metabolites are extracellular compounds secreted into the culture medium during growth of the microorganism that can be isolated and characterised for industrial purposes. Among secondary metabolites, antimicrobial agents, which aid in the survival of fungi in the environment, stand out [4, 5]. It is estimated that 78% of antimicrobials available on the market, such as penicillin, gentamicin, streptomycin, and chloramphenicol, are derived from natural products [6 - 9]. The diversity of fungi offers many sources of natural antimicrobials [10].

*Fusarium oxysporum* Schldl. is a filamentous, endophytic fungus, and saprophytic the lives in the soil [11, 12]. Although most studies have reported the toxicity of their metabolites in plants, few have revealed the health potential of these metabolites [7, 8, 12]. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of secondary metabolites present in the submerged culture filtrate of *F. oxysporum* as well as identify the major compounds present in the aqueous extract.

## 2. Methods

### 2.1. Strains

The fungal strain *F. oxysporum* PR-33 was collected in Torres-Rio Grande do Sul, Brazil, and has been deposited in the collection of fungi from the Laboratory of Enzymes and Biomass, University of Caxias do Sul, Brazil. As target microorganisms, five strains of Gram-positive bacteria, seven strains of Gram-negative bacteria and two yeast strains of the genus *Candida* (Table 1). All bacterial and yeast strains were donated by Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

## 2.2. Molecular identification

DNA extraction for identification of the PR-33 isolate was performed using the commercial PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.). DNA amplifications were performed by polymerase chain reaction (PCR) with the Phusion High-Fidelity<sup>™</sup> PCR kit (Finnzymes). The primers ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') [13] were used, with amplification between 600 and 800 bp. For purification of the sample, the enzymes exonuclease I (Amershan Bioscience, 2500 U) and shrimp alkaline phosphatase (Amershan Bioscience, 5000 U) were used. The sample was sequenced on an ABI-PRISM 3130xl automated sequencer (Applied Biosystems) using the fluorescently labelled dideoxynucleotide technique, resulting in an electropherogram. Identification of the fungus was done by comparing the DNA sequences obtained with the sequences deposited in GenBank using the *BLAST* tool.

## 2.3 Culture media

The *F. oxysporum* strain was maintained in medium containing 20 g.L<sup>-1</sup> wheat bran; 20 g.L<sup>-1</sup> sawdust of *Pinus* sp.; 2 g.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>; and 20 g.L<sup>-1</sup> agar. After peal, the plates were incubated at 28°C for 7-10 days, and thereafter stored at 4°C.

To produce extracts, which were evaluated for their antimicrobial activity, nutrient broth supplemented with 10 g.L<sup>-1</sup> of glucose, was used bacterial strains, as well as disc diffusion tests, was performed using nutrient agar (Kasvi<sup>®</sup>). Sabouraud agar medium (Kasvi<sup>®</sup>) was used for yeasts.

**Table 1.** Inhibition diameter (mm) resulting from the metabolites of the *Fusarium oxysporum* fungus produced in different days of culture in flask (EF) and in bioreactor (EB) on Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts of the genus *Candida*.

Form of production and microorganism	Inhibition (mm)*													
	2 days		3 days		4 days		5 days		7 days		9 days		Control**	
	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	Positive**	Negative
<b>Gram-negative</b>														
<i>Escherichia coli</i> OP50	10.6±0.4 <sup>a</sup>	9.8±1.1 <sup>a</sup>	10.0±0.0 <sup>a</sup>	9.8±1.1 <sup>a</sup>	11.0±1.0 <sup>a</sup>	13.3±1.3 <sup>b</sup>	9.5±2.5 <sup>a</sup>	7.5±0.5 <sup>a</sup>	13.6±1.3 <sup>b</sup>	7.6±0.8 <sup>a</sup>	15.6±0.7 <sup>b</sup>	9.6±1.0 <sup>a</sup>	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	8.1±2.4 <sup>a</sup>	9.0±1.0 <sup>a</sup>	9.0±1.4 <sup>a</sup>	8.8±2.0 <sup>a</sup>	11.8±1.6 <sup>a</sup>	8.8±2.0 <sup>a</sup>	14.1±1.2 <sup>b</sup>	9.0±1.0 <sup>a</sup>	10.3±1.2 <sup>a</sup>	8.3±0.5 <sup>a</sup>	11.5±1.6 <sup>a</sup>	7.6±1.2 <sup>a</sup>	17.5±2.1 <sup>b</sup>	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15669	-	-	-	7.0±1.4 <sup>a</sup>	11.0±1.4 <sup>b</sup>	8.0±1.4 <sup>a</sup>	-	8.5±2.1 <sup>a</sup>	12.5±0.7 <sup>b</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>	8.0±2.8 <sup>a</sup>	8.0±0.6 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 19429	6.5±0.7 <sup>a</sup>	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>	-	12.0±4.2 <sup>b</sup>	-	12.5±0.7 <sup>b</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>	-	8.0±1.4 <sup>a</sup>	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA1705	11.5±2.1 <sup>b</sup>	-	7.5±0.7 <sup>a</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	10.0±1.4 <sup>b</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	7.5±2.1 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	10.5±0.7 <sup>b</sup>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 1906	12.5±4.9 <sup>b</sup>	-	6.5±0.7 <sup>a</sup>	-	10.0±1.4 <sup>b</sup>	-	7.5±0.7 <sup>a</sup>	-	11.0±1.4 <sup>b</sup>	-	12.0±2.8 <sup>b</sup>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	8.0±1.4 <sup>a</sup>	-	10.0±0.0	8.0±1.4 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>	9.5±0.7 <sup>a</sup>	8.5±2.1 <sup>a</sup>	10.5±0.7 <sup>b</sup>	-	8.5±0.7 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>	-	24.0±0.0 <sup>c</sup>	-
<b>Gram-positive</b>														
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10.5±2.2 <sup>a</sup>	-	10.1±1.4 <sup>a</sup>	-	13.8±2.1 <sup>b</sup>	-	16.5±2.1 <sup>b</sup>	-	13.5±2.2 <sup>b</sup>	-	13.3±2.0 <sup>b</sup>	-	15.5±7.7 <sup>b</sup>	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	14.8±2.9 <sup>b</sup>	7.0±1.0 <sup>a</sup>	13.3±2.8 <sup>b</sup>	8±0.6 <sup>a</sup>	17.1±0.8 <sup>b</sup>	14.3±2.8 <sup>b</sup>	13.3±1.2 <sup>b</sup>	18.0±1.7 <sup>b</sup>	9.8±0.3 <sup>a</sup>	-	14.3±3.4 <sup>b</sup>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	10.0±0.0 <sup>a</sup>	-	15.0±2.8 <sup>b</sup>	-	12.0±1.4 <sup>b</sup>	9.0±0.0 <sup>a</sup>	9.5±4.9 <sup>a</sup>	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	9.5±0.7 <sup>a</sup>	-	11.5±2.1 <sup>b</sup>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	11.0±1.4 <sup>b</sup>	-	14.0±8.4 <sup>b</sup>	-	9.5±0.7 <sup>a</sup>	-	14.5±2.1 <sup>b</sup>	-	16.0±1.4 <sup>b</sup>	-	9.5±0.7 <sup>a</sup>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10100	19.0±0.0 <sup>b</sup>	-	17.0±2.4 <sup>b</sup>	-	9.0±4.2 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>	7.0±1.4 <sup>a</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	10.0±0.0 <sup>a</sup>	-	12.0±1.4 <sup>b</sup>	-	7.5±0.7 <sup>a</sup>	-
<b>Yeast</b>														
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	11.5±4.9 <sup>b</sup>	-	6.5±0.7 <sup>a</sup>	-	7.5±2.1 <sup>a</sup>	11.0±1.4 <sup>b</sup>	17.0±0.0 <sup>b</sup>	-	11.0±4.2 <sup>b</sup>	-	11.0±2.8 <sup>b</sup>	-	12.5±0.5 <sup>b</sup>	-
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	18.5±4.9 <sup>b</sup>	-	8.0±1.4 <sup>a</sup>	-	8.0±1.4 <sup>a</sup>	-	8.5±0.7 <sup>a</sup>	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>	-	9.0±1.4 <sup>a</sup>	-	9.0±1.0 <sup>a</sup>	-

(-) resistant (no formation of inhibition halo). Measurements of halos include 5 mm of disk.

\*Measured after 24 h of incubation at 37°C. Duplicate measurements and estimation of standard deviation. Statistical analysis between the bacterium and different culture times for the extract production (horizontal line).

Values marked with the same letter did not differ significantly ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis with ANOVA and Student's *t*-test.

\*\*For positive controls, amoxicillin (10 mcg) and fluconazole (32 mcg) were used for bacteria and yeast, respectively.

## 2.4 Cultivations for the production of secondary metabolites

500 mL-Erlenmeyer flasks containing 100 mL of nutrient broth supplemented with glucose were used. Each flask was inoculated with  $2.2 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> conidia of *F. oxysporum*. The flasks were maintained at 28°C under reciprocal shaking at 180 rpm. Triplicates were made for each culture timepoint (2, 3, 4, 5, 7, and 9 days).

In a bioreactor, a pre-inoculum was made at 5% (w/v) containing nutrient broth and glucose. The flasks were inoculated as previously described and cultured with reciprocal shaking of 180 rpm for 24 h at 28°C.

The assays were performed in a stirred tank bioreactor (New Brunswick®, BioFlo®/Celligen®115 model) using a working volume of 10 L. Nutrient broth supplemented with glucose was used in bioreactor cultures. Cultivation was maintained for 9 days at 28°C with agitation at 200–400 rpm, aeration rate of 0.5–2 vvm, and without pH control, although this parameter was analysed daily. The oxygen dissolved in the broth was maintained at values greater than 30% saturation. A 300 mL sample was collected daily.

## 2.5 Preparation of extracts

The extracts were produced from the broth of submerged cultures. The broth was centrifuged (3220 g, 20 min at 4°C). The supernatant was lyophilised and a known concentration (100 mg.mL<sup>-1</sup>) of lyophilised extract was dissolved in sterile distilled water and sterilised by filtering through a 0.22 µm pore filter.

## 2.6 Evaluation of the antimicrobial activity of the extract

### 2.6.1 Disk diffusion

Volumes of 15 µL (100 mg.L<sup>-1</sup>) of the extract were distributed on sterile filter paper discs with a diameter of 0.5 cm and a density of 250 g.m<sup>-2</sup>. The negative control was performed using 15 µL of sterile water, the solvent used to dilute the extract.

Cultures of the microorganisms were grown in nutrient broth overnight, and their concentration standardised at 10<sup>8</sup> cells.mL<sup>-1</sup>. On the inoculated microorganisms were distributed the disks containing the extract of *F. oxysporum*. The plates were maintained at 37°C for 24 h. Inhibition of microbial growth was assessed by measuring the halo of inhibition (mm) of growth. The positive control was performed using commercial antibiograms (Sensifar®), containing amoxicillin (10 mcg) for bacteria and fluconazole (32 mcg) for yeast. The tests were performed in duplicate.

### 2.6.2 Microbial growth inhibition

Microbial growth inhibition determination was performed with the extract concentration ranging from 100 to 3.1 mg.mL<sup>-1</sup>. For the determination of MIC, a methodology described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [14] and Elshikh et al. (2016) [15] was used with some modifications due to dark color of the extract that made it difficult to read absorbance. These modifications consisted of centrifuging the plates (3220 g, 20 min at 4 ° C) and the supernatant was removed, adding 300 µl of saline solution (0.9%) to each well. The procedure was repeated until complete washing of the microbial cells.

The positive control was performed only with the bacterial culture and 245 µL of water. After 24 h, the absorbance was read at 560 nm. The percent inhibition was calculated according to Equation 1.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(100 - \text{Absorbance of the sample})}{\text{Absorbance of the control well}} \times 100 \quad \text{Equation (1)}$$

### 2.7 Identification of metabolites

The extract was dissolved in 100 mg.mL<sup>-1</sup> and semi-purified by solid phase extraction. Strata cartridges (Phenomenex®) were activated with 2 mL of methanol and conditioned with 12 mL of aqueous solution acidified with 0.01% HCl. Then, 2 mL of extract was added to the cartridge. The cartridges were washed with 12 mL of aqueous solution acidified with 0.01% HCl to remove interfering compounds, sugars, and other high molecular weight molecules. Phenolic and nitrogen compounds were eluted with 1800 µL of methanol with 2% formic acid and stored in amber tubes at -20°C until analysis. Prior to HPLC injection, the samples were evaporated on a rotary evaporator and the residue obtained was reconstituted with acidified water (0.5% formic acid) to 1 mL and filtered through a cellulose acetate membrane (0.22 µm).

A Shimadzu HPLC apparatus equipped with two pumps (LC-20AD), online degasser (DGU-20A), automatic injector (SIL20AHT), oven (CTO-20A) connected in series to a DAD detector (SPD-M20A), and mass spectrometer (MS) with quadrupole-time of flight analyser and an electrospray ionisation source (ESI) of Bruker Daltonics, micrOTOF-Q II model, was used to identify the metabolites.

The compounds were separated on a Discovery® C<sub>18</sub> column Supelco® (5µm, 15 cm × 4.6 mm), using as the mobile phase a linear gradient of water/0.5% formic acid

(solvent A) and acetonitrile/0.5% formic acid (solvent B), at a flow rate of 0.7 mL/min and a column temperature of 29°C [16]. The spectra were obtained between 200 and 600 nm and the chromatograms processed at 271 nm. The mass spectra were acquired with a scan range of  $m/z$  100 to 1000; and the MS parameters were as follows: ESI source in positive ionisation mode; capillary voltage: 3000 V, end plate offset: -500 V, drying gas temperature (N<sub>2</sub>): 310°C, flow: 8 L.min<sup>-1</sup>, nebuliser: 30 psi, and MS/MS fragmentation in automatic mode. Analysis of the chromatograms and mass spectra was done using DataAnalysis software 4.3. For the analyzes were ignored the compounds initially present in the culture medium.

### 2.8 Quantification of metabolites

Metabolites were quantified by HPLC-DAD, using a nine-point analytical curve of 5-fusaric acid (0.024 to 6.25 µg.mL<sup>-1</sup>). The analytical curve was linear ( $r^2 = 0.997$ ), the limit of detection was 2 µg.mL<sup>-1</sup>, and the limit of quantification was 7 µg.mL<sup>-1</sup>.

### 2.9 Cell viability assay

Extract toxicity was evaluated in the human cell lines HEK293 (embryonic kidney/ATCC®CRL-1573<sup>TM</sup>) and SH-SY5Y (neuroblastoma/ATCC®CRL-2266<sup>TM</sup>). Cell viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; USB Corporation, Cleveland, USA) assay. Cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum and 1% ampicillin/streptomycin, and seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well in a 96-well plate. The cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h before the assay. Increasing volumes of the extract (3.1 to 100 mg.mL<sup>-1</sup>) were incubated with the cells for 24 h; following this, the medium was removed, and a 5 mg.mL<sup>-1</sup> MTT solution was added. Cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 4 h. Following this, 100 µL of dimethyl sulphoxide was added to dissolve the blue formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm using a plate reader (Anthos, Hamburg, GER) after adjusting the pH with Sorensen's glycine buffer. Cells incubated only in DMEM were used as a control for 100% cellular viability, while 0% viability was obtained after incubation of cells with Triton X-100 (2%, w/v) [17].



### 2.10 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism 6, using variance tests (ANOVA), after which the Student's *t*-test was applied with  $p < 0.05$ .

## 3. Results

**3.1 Molecular identification of the fungus** Sequencing of the ITS1–ITS4 regions of the isolate was performed, and 99% similarity to *F. oxysporum* was obtained (deposit number MK521437). Table 1 contains the data obtained on the diameter of the inhibition halo produced by the extract on different days of culture, in flasks (EF) and the bioreactor (EB).

### 3.2 Disk diffusion

For Gram-negative bacteria, extracts of *F. oxysporum* showed inhibition of microbial growth of all microorganisms tested in at least one type of production (EB or EF) and at all evaluated times (with the exception of *E. coli* ATCC 15669, which did not show a halo on day 2 in EB and EF). The maximum inhibition of Gram-negative microorganisms was demonstrated with *E. coli* OP50 by the extract collected at day 9 of culture. In addition, differential antimicrobial activity was observed for the two strains of *E. coli* evaluated, a fact that was repeated for the commercial antibiotic used as a control. It is noteworthy that all extracts produced by *F. oxysporum* presented inhibition of microbial growth for *E. coli* OP50, while the antibiotic amoxicillin did not demonstrate the same effect. The commercial antibiotic also had no inhibitory effect against *A. baumannii*, whereas the EF extract produced a 12.5 mm inhibition halo at day 2 of culture (Table 1).

For the Gram-positive bacteria evaluated, it was verified that the extracts from the cultures in the bioreactor were unable to inhibit the formation of microbial growth halos at any time for *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* ATCC 12228, whereas in the EF cultures, halo formation was observed. These data indicate the need for optimisation of culture conditions or that under conditions of scale-up, situations such as hydrostatic pressure have a negative effect on the production of antimicrobial metabolites. The mean diameter of the inhibition halos for Gram-positive microorganisms was higher compared with the Gram-negative microorganisms, indicating a possible action of the extract on cellular peptidoglycans.

For the two yeasts evaluated, the potential of fungal extracts obtained from EF culture was also shown to inhibit the development of these microorganisms. Inhibition of

*C. tropicalis* was greater than that of *C. albicans*. The inhibition results of the EF extracts are compatible with those of the fluconazole control.

### 3.3 Microbial growth inhibition

It was not possible to accurately read absorbance with inoculum of less than  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, proving the need for another technique to interpret microbial growth inhibition results for natural products whose color influences the absorbance reading.

The percent inhibition and target microorganisms are shown in Table 2, using inoculum concentration of  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. The maximum concentration of the extract tested for both (from flasks and bioreactor) cultures (100 mg.mL<sup>-1</sup>) resulted in a mean inhibition ranging from 60–80%, however, although it was necessary to use a high microbial contraction in the test, the potential of these extracts is verified mainly against Gram-negative bacteria.

Concentrations of the EB extract below 12.5 mg.mL<sup>-1</sup>, corresponding to 37.5 µg of fusarinolic acid and its isomer, 20 µg of dehydrofusaric acid, and 0.75 µg of fusaric acid, showed no inhibition against *C. albicans*, both strains of *E. coli* and *S. aureus*, *A. baumannii*, or *E. faecalis*. When the EF extract was evaluated, the concentration at which there was no growth of some of the microorganisms tested was lower (6.25 mg.mL<sup>-1</sup>), since the concentration of the secondary metabolites was higher, 43.75 µg, 25.7 µg and 5 µg for fusarinolic acid and its isomer, 20 µg of dehydrofusaric acid, and 0.75 µg of fusaric acid, respectively. Therefore, the percentage of inhibition varied between the microbial species tested and the extracts produced (Table 2 and Table 3).

**Table 2.** Percent inhibition of microbial growth by different concentrations of *Fusarium oxysporum* culture extracts conducted in flask cultures and in bioreactor.

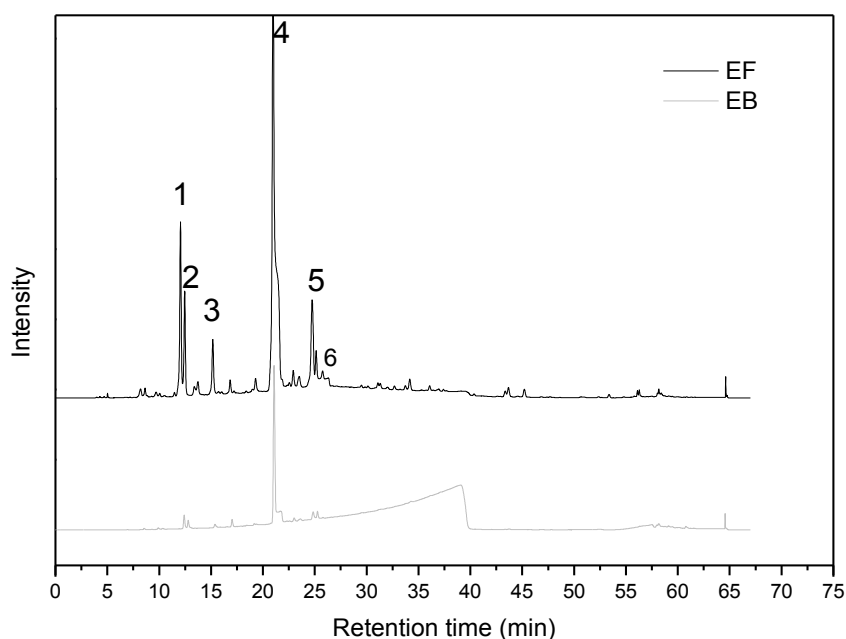
microorganism	growth inhibition (%)											
	extract concentration (mg.mL <sup>-1</sup> )											
	100		50		25		12.5		6.25		3.1	
	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB
<b>Gram-negative</b>												
<i>Escherichia coli</i> OP50	83	64	84	40	80	16	87	0	66	0	51	0
<i>Salmonella</i>	84	84	67	84	53	80	49	81	38	35	11	48
<i>Typhimurium</i> ATCC 14028												
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15669	82	71	77	37	59	0	52	0	31	0	17	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 19429	85	50	0	30	0	30	0	28	0	28	0	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA1705	82	85	65	76	58	74	41	46	39	31	39	13
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 1906	67	77	65	67	19	46	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	83	85	79	75	76	49	51	34	51	27	0	6
<b>Gram-positive</b>												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	81	74	66	30	69	22	65	9	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	81	89	75	88	60	82	61	74	0	71	0	17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	81	75	76	71	52	35	23	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	62	91	34	91	9	88	6	78	0	69	0	27
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10100	75	78	75	66	47	56	19	32	12	0	12	0
<b>Yeast</b>												
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	53	74	48	40	43	3	48	0	40	0	9	0
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	63	80	65	46	60	29	57	25	50	12	9	2

\* The experiment was performed in triplicate, reading at 560 nm, after incubation for 24h.

### 3.4 Identification of substances

In Figure 1, the chromatograms of the extracts are presented; the profile of the major components was similar for both extracts (EF and EB). Six compounds were separated and four were identified based on combined information obtained from chromatographic elution on the C<sub>18</sub> column, UV-vis, and mass spectra characteristics (Table 3). The major

(%) metabolites were fusarinolic acid (and its isomer), fusaric acid, and dehydrofusaric acid, representing more than 66.6% of the total secondary metabolites.



**Figure 1.** Chromatograms obtained from *Fusarium oxysporum* extracts produced in flask (EF) and bioreactor (EB) after 4 days of cultures by HPLC analysis following solid phase extraction.

**Table 3.** Chromatographic and spectroscopic characteristics of compounds analyzed by HPLC-DAD-ESI-MS analysis. The numbering of the peaks corresponds to the identification in Figure 2.

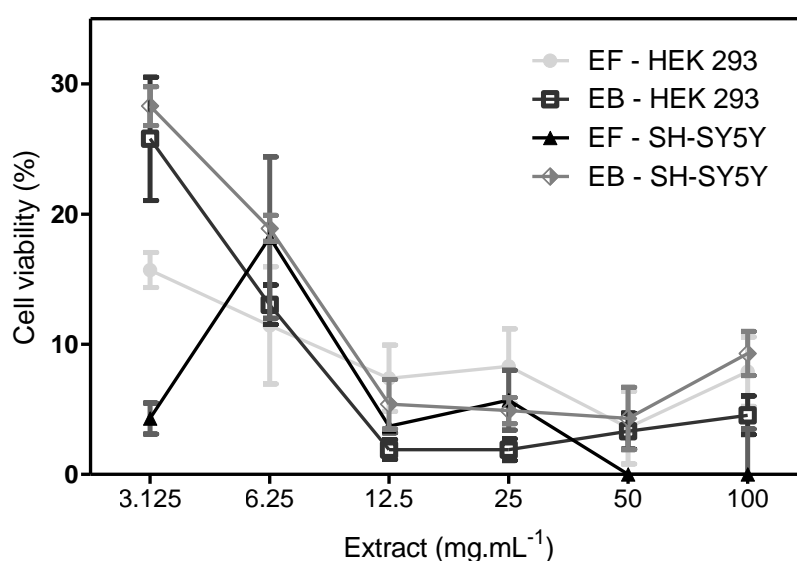
Peak	Compound	$t_r$ (min)	$\lambda$ máx (nm)	$[M+H]^+$	$MS^2(+)$	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	
						EF	EB
1	Fusarinolic acid	12.2	271	196.1033	168.1072		
2	Isomer Fusarinolic acid	12.6	271	196.1027	-	7*	3*
3	Not identified	15.2	271	314.2037	247.1116	0.1	0.4
4	Dehydrofusaric acid	21.1	271	178.0915	150.0959	4.4	1.6
5	Fusaric acid	24.9	271	180.1065	152.1109	0.8	0.06
6	Not identified	25.1	444	377.1525	243.0936		

\* The concentration of fusarinolic acid and its isomer were calculated together, because it was not possible to separate adequately.

The amount of fusaric acid in EF was 10 times higher than that present in the EB extract and indicates that fusaric acid is responsible for the antimicrobial activity of the extracts.

### 3.5 Cell viability assay

The cell viability assay demonstrated that the addition of increasing amounts of extract decreased cell viability (Figure 2). For HEK293 cells, the EB extract was more toxic to cells at higher concentrations ( $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), resulting in 4% viable cells, or half of the cells compared to EF extract. When SH-SY5Y cells were analysed, the results were reversed, the EF extract exhibited higher toxicity, resulting in no viable cells at concentrations of 50 and  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figure 2.** Cell viability (%), using HEK-293 cells and SH-SY5Y cells, treated with extracts produced in flasks (EF) and extracts produced in bioreactor (EB).

## 4 Discussion

Fusarium acid (5-butylpicolinic acid) was the first described secondary metabolite from a *Fusarium heterosporum* culture [18 - 20]. In this culture, in addition to fusaric acid, two natural analogues, dehydrofusaric acid and hydrofusaric acid, were also identified [19, 20]. Fusaric acid is not a secondary metabolite often synthesised by *Fusarium* spp., it appears to be related to strains that colonise grains. Although described as a phytotoxin, fusaric acid has been studied for pharmacological applications. Bacon *et*

*al.* [20] have indicated that fusaric acid is a mycotoxin of low toxicity, with important pharmacological potential, as a dopamine- $\beta$ -hydroxylase inhibitor, an enzyme that acts on norepinephrine synthesis. *In vivo*, fusaric acid has antihypertensive and antitumoral effects [22, 23, 24]. The test dose, as antihypertensive, fusaric acid in rabbits, was 50 mg/kg and not toxic to animals [23].

Although Sondergaard *et al.* [22] describe fusaric acid as a potential antimicrobial agent against *Lactobacillus acidophilus* and *E. coli*, its antimicrobial effect has been poorly studied.

The secondary metabolites produced by the *F. oxysporum* PR-33 isolate, including fusaric acid, under the described culture conditions, showed activity against the 14 microorganisms tested; i.e., they have a broad-spectrum effect. These results corroborate those described by Zhang *et al.* [18], in which the substances produced by *F. oxysporum* were shown to have an effect against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The maximum production day of the compounds could not be determined, since the halos varied according to the tested microorganism and the type of culture. It was shown, however, that the compounds are produced later when cultivated in bioreactors compared with flasks, consistent with the results of Hidaka *et al.* [23], which described the production of fusaric acid between day 2 and 7 of cultivation, when fusaric acid was produced in flask. For cultivation in a bioreactor, the authors described fusaric acid production only on day 4 of cultivation. This difference in the production of metabolites can be explained by the controlled environment of the bioreactor, since fungi secrete antimicrobial secondary metabolites as a form of defence in stressful environments or during stationary growth.

As described in this study, Li *et al.* [26] also demonstrated the inhibitory effect of fusaric acid on *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. The inhibition halos observed by Musavi and Balakrishnan [19], using methanolic extract, were greater than those observed in this work, and for *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *C. albicans* were 21, 19.4, 20.2, and 18.6 mm, respectively. These results are noteworthy, since methanol may have contributed to a more efficient extraction of additional compounds with antimicrobial activity. The advantage of producing an extract in which the solvent is water, is that in addition to it not influencing the results, its applicability is facilitated in the pharmaceutical or food industry. Gashgari *et al.* [27] isolated several endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia, including *F. oxysporum*. This isolate was used for disk diffusion tests, and did not exhibit inhibition against *E. faecalis*; moderate inhibition

(2–10 mm) against *E. coli*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*; and inhibition (> 10 mm) against *P. aeruginosa*. The inhibition of all bacteria tested by the researchers [25] was greater than 10 mm. Tchoukoua *et al.* [29] isolated three compounds from the extract, and showed in disc diffusion tests that there was no inhibition of *P. aeruginosa* and 1 mm inhibition of *S. aureus*. Sondergaard *et al.* [25] did not observe inhibition halos against *S. aureus* or *S. Typhimurium* using fusaric acid.

For the reading of the absorbance in microbial growth inhibition tests, the inoculum used had to be higher than the recommended [14], which made it difficult the development of the tests, since none of the tested microorganisms reached 90% inhibition due to the high microbial load used in the tests. These data corroborate with what has already been described by some authors [15, 31, 32] the need for other methods for the interpretation of microbial growth inhibition when analyzing dense natural products such as oils or dark stains. Another factor worth mentioning is that standardized methods refer to pure products rather than raw extracts.

The microbial growth inhibition determined by EB was twice the concentration of the extract when compared to the EF, demonstrating the influence of the concentration of the secondary metabolites according to the condition in which the fungus was submitted and different microbial growth inhibition according to the target microorganism. Zhang *et al.* [18], using extract produced by *Fusarium* sp. JY2 grown in submerged culture, also verified different microbial growth inhibition according to the target microorganism. These authors also observed strong antimicrobial activity especially against *Pseudomonas aeruginosa* by increasing the permeability of cell membranes.

Some microorganisms, *A. baumannii* ATCC 1906, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 19429 and *C. tropicalis* ATCC 28707, did not form inhibition halos, although those microorganisms were inhibited in the using extract produced by *Fusarium* sp. JY2 grown in submerged culture, also verified different microbial growth inhibition according to the target microorganism. These authors also observed strong antimicrobial acti assays. This difference is probably due to the diffusion of secondary metabolites in solid culture medium. Although this difference was observed in some tests, there was compatibility between most of the viability values and the halo assays, indicating the action of the compounds on target microorganisms, not just an antagonistic reaction. These results also emphasize the importance of using both tests for the evaluation of antimicrobial activity.

In contrast with the literature, no phenolic components related to antimicrobial activity were found in the extracts tested [33]. In this work, the main secondary metabolites of *F. oxysporum* were identified as fusaric acid and its derivatives: fusarinolic acid, an isomer, and dehydrofusaric acid. The amount of fusaric acid in the flask cultures was much higher than in the bioreactor culture, which explains the difference in inhibition in the tests. Amalfitano *et al.* [34] used two strains of *F. oxysporum* and after 4 weeks of flask cultivation using dextrose and agar potato medium obtained a production of 424 and 690 mg.L<sup>-1</sup> of fusaric acid, respectively. Shinde and Deshmuki [35] used vial cultures with Czapeck-Dox medium, which is ideal for the production of fusaric acid, to determine optimal culture conditions. According to this study, production increased from day 4 of cultivation, with a maximum at day 20 (606.66 µg/L), and after 30 days of cultivation, production decreased. The researchers also determined that the ideal pH and temperature are 3 and 30°C, respectively. In the present study, in only 4 days, acid production was approximately 0.8 µg/mL, which was greater than that obtained in the study of Shinde and Deshmuki [34]. In contrast to that described by these authors [34], the increase in pH did not decrease the production of fusaric acid, since the pH of the EF and EB extracts at day 4 was 8 and approximately 7, respectively, and acid production in the EF extract was 10-fold higher. Therefore, in vial culture, an ideal microenvironment for the growth of the fungus and consequently the production of fusaric acid was proposed. The antimicrobial activity of fusaric acid is related to the inhibition of bacterial quorum sensing, which would reduce bacterial resistance [35].

Although the compounds in the extracts demonstrated inhibitory effects against the tested microorganisms, they also demonstrated toxic effects in human cells. It cannot be stated which of the compounds was responsible for the cytotoxicity, since the results differed for each type of cell tested. The toxicity in HEK293 cells did not appear to be related to the amount of fusaric acid, since the EF extract contains more fusaric acid and was less toxic. The toxicity may be related to component 3,  $m/z$  [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 314.203, which we were unable to identify and was higher in the EB extract. In SH-SY5Y cells, fusaric acid may have been responsible for the cellular toxicity, since the EF extract was more toxic. Abdul *et al.* [36] reported that cellular damage caused by fusaric acid is due to its ability to induce the cell to mitochondrial stress, produce catalytic metalloproteins, increase DNA damage, and induce apoptosis. In their trials [36], they describe IC<sub>50</sub> value of fusaric acid as 104 µg.mL<sup>-1</sup> in hepatocellular carcinoma cells. For HeLa cells, the cytotoxic concentration was determined to be between 200 and 400 µg.mL<sup>-1</sup> [37]. In the



present study, lower concentrations of fusaric acid were cytotoxic. For HEK-293 cells, a 50 mg.mL<sup>-1</sup> dose of the EF extract (equivalent to 40 µg.mL<sup>-1</sup> of fusaric acid) was toxic in 92% of cells, whereas in SH-SY5Y cells, half of that dose (20 µg.mL<sup>-1</sup>) was able to inhibit 100% of cell growth. The results may indicate that the set of metabolites identified may be responsible for cytotoxicity. Another possibility is that the toxicity observed was partially due to the pH of the extracts. When added at higher concentrations, they even changed the color of the medium, evidencing pH alterations. It will be important in future studies to separate and study the different compounds individually.

In terms of antimicrobial activity, fusaric acid appears to be the primary compound, demonstrating activity against bacteria responsible for opportunistic infections, especially in immunosuppressed patients. Its use requires caution, however, since its antimicrobial activity may be related to its toxic effects on cellular activity.

To conclude, the crude extracts of *F. oxysporum* produced in flasks and bioreactors were determined to contain the same major compounds, although the concentration of metabolites varied. Flask cultivation conditions resulted in the highest production of fusaric acid and its derivatives, which demonstrated a broad spectrum of action against the tested microorganisms. In light of the need to develop new antimicrobial agents, the identified compounds can be individually studied for the development of novel drugs or antimicrobial agents, as well as to further understanding their cytotoxicity.

### **Conflict of interest statement**

The authors declared have no conflict of interest.

### **Funding**

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 472153/2013-7 and 310255/2012-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 16/2551-0000246-0), and Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES3255/2013). Itapeva State Park and the Rio Grande do Sul Environmental Secretariat for the authorization of collections (26/2013).

### **Ethical approval**

Not required.

## References

- [1] Appelbaum P C. 2012 and Beyond: Potential for the Start of a Second Pre-antibiotic Era? *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2062-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dks213>.
- [2] van der Waaij D, Nord CE. Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 16:191-7. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00227-2).
- [3] Durand GA, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 18:30335-2. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.
- [4] de Boer W, Folman L B, Summerbell R C, Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *Microbiol Reviews.* 2005; 29: 795-811. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.005>.
- [5] Conti R, Guimarães D O, Pupo M T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Cien Cult.* 2012; 64: 43-7. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000300014>.
- [6] Wang M, Kornsakulkarn J, Srichomthong K, Feng J-K, Liu T, Isaka M, Thongpanchang C. Antimicrobial anthraquinones from cultures of the antipathogenic fungus *Cordyceps morakotii* BCC 56811. *J Antibiot.* 2019. doi: 10.1038/s41429-018-0135-
- [7] Kumar C G, Mongolla P, Joseph J, Nageswar YVD, Kamal A. Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Mycol Méd.* 2010; 20:283-9. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.08.002>.
- [8] Khan A A, Bacha N, Ahmad B, Lutfullah G, Farooq U, Cox RJ. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pacific J Tropical Biomed.* 2014; 4:859-70.
- [9] Dutreix L, Bernard C, Juin C, Imbert C, Girardot M. Do raspberry extracts and fractions have antifungal or anti-adherent potential against *Candida* spp.? *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52:947-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.020>.
- [10] Ren L, Hemar Y, Perera C O, Lewis G, Krissansen G W, Buchanan P K. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extract of eight edible

- mushrooms. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*. 2014; 3: 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.003>.
- [11] Manganyi M C, Regnier T, Olivier E I. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. *S Afr J Bot*. 2015; 99: 115- 21. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.192>.
- [12] Hussain H, Drogies K, Al-Harrasi A, Hassan Z, Shah A, Rana U A, Green I R, Draeger S, Schulz B, Krohn K. Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium* sp. *Asian Pac J Trop Dis*. 2011; 5: 186-7. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60650-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60650-2).
- [13] White T J, Bruns S L, Taylor J W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 1990. Academic Press, Inc., New York.
- [14] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd informational supplement. M27–S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, Wayne, PA.
- [15] Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat I M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol. Lett*. 2016, 38: 1015-1019. DOI 10.1007/s10529-016-2079-2.
- [16] Rodrigues E, Mariutti L R B, Mercadante A. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem*. 2013, 61 : 3022-29. doi: 10.1021/jf3054214.
- [17] Schuh R, Poletto E, Fachei F N S, Matte U, Baldo G, Teixeira H F. Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide : Implications for CRISPR/Cas technology. *J. Colloid Interface Sci*. 2018, 15: 243-55. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.06.058>
- [18] Zhang H, Sun X, Xu C. Antimicrobial activity of endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from medicinal honeysuckle plant. *Arch Biol Sci Belgrade*. 2016; 68:25-30. doi: 10.2298/ABS140401004Z.
- [19] Musavi S F & Balakrishnan R M A. Study on the Antimicrobial Potentials of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. *J Med Biol Eng*. 2014; 3: 162-6. Doi: 10.12720/jomb.3.3.162-166.

- [20] Bacon C W, Porter J K, Norred W P, Leslie J F. Production of Fusaric Acid by *Fusarium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 1996 ; 62: 4039-43.
- [21] Tung T T, Jakobsen T H, Dao T T, Fuglsang A T, Givskov M, Christensen S B, Nielsen J. Fusaric acid and analogues as Gram – negative bacterial quorum sensing inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2017 ; 126: 1011-20. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.11.044.
- [22] Wang H & Ng T T. Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylicolinic acid). *Life Sci.* 1999 ; 65: 849-56.
- [23] Hidaka H, Nagatsu T, Takeya K. Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi. *J Antibiot.* 1969; 5: 228-30.
- [24] Li X, Zhang Z L, Wang H F. Fusaric acid (FA) protects heart failure induced by isoproterenol (ISP) in mice through fibrosis prevention via TGF- $\beta$ 1/SMADs and PI3K/AKT signaling pathways. *Biomed Pharmacother.* 2017; 93: 130-45. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.002.
- [25] Sondergaard T E, Fredborg M, Christensen A O, Damsgaard S K, Kramer N F, Giese H, Sorensen J L. Fast Screening of Antibacterial Compounds from *Fusaria*. *Toxins.* 2016, 8: 1-9.
- [26] Li J, Sun W, Guo Z, Lu C, Shen Y. Fusaric acid modulates Type Three Secretion System of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 ; 449: 455-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.044.
- [27] Gashgari R, Gherbawy Y, Ameem F, Alsaharari S. Molecular Characterization and Analysis of Antimicrobial Activity of Endophytic - From Medicinal Plants in Saudi Arabia. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9: 1-8. doi: 10.5812/jjm.26157.
- [28] Barbosa P P M, Speranza P, Ohara A, Silva E B, Angelis D A, Macedo G A. Fungi from Brazilian Savannah and Atlantic rainforest show high antibacterial and antifungal activity. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2017; 10:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.01.011>.
- [29] Tchoukoua A, Hasegawa R, Hendrapipta K A, Sato S, Koseki T, Shiono Y. Structure elucidation of new fusarielins from *Fusarium* sp. and their antimicrobial activity. *Magn Reson Chem.* 2017; 56: 32-6. <https://doi.org/10.1002/mrc.4662>.
- [30] Shen H, Shao S, Chen J C, Zhou T. Antimicrobials from Mushrooms for Assuring Food Safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017; 16: 316- 29. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12255>.

- [31] Far F E, Al-Obald M M J, Desa M N M. Efficacy of modified Leeming- Notman media in a resazurin microtiter assay in the evaluation of in-viro activity of fluconazole against *Malassezia furfur* ATCC 14521. *J Mycol Med.* 2018, 28: 486-491. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.04.007.
- [32] Teh C H, Mazni W A, Nurulhusna A H, Norazah A, Lee H L. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin- based turbidometric assay. *BMC Microbiol.* 2017, 17: 1-8. DOI 10.1186/s12866-017-0936-3.
- [33] Amalfitano C, Pengue R, Andolfi A, Vurro M, Zonno M C, Evidente A. HPLC Analysis for Fusaric Acid, 9,10-Dehydrofusaric acid their Methyl Esters, Toxic Metabolites from Weed Pathogenic *Fusarium* Species. *Phytochem Anal.* 2002; 13: 277-82. <https://doi.org/10.1002/pca.648>.
- [34] Shinde S B, Deshmukh H V. Estimation of fusaric acid from culture filtrate of *Fusarium udum* by thin layer chromatography. *Asian J Bio Scien.* 2014; 9: 251-4.
- [35] Tung T T, Jakobsen T H, Dao T T, Fuglsang A T, Givskov M, Chrisensen S B, Nielsen J. Fusaric acid and analogues as Gram – negative bacterial quorum sensing inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2017; 126: 1011-20. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.044>.
- [36] Abdul N S, Nagah S, Chutugoon A A. Fusaric acid induces mitochondrial stress in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Toxicol.* 2016, 119: 336-44. doi: 10.1016/j.toxicol.2016.07.002.
- [37] Mamur S, Unal F, Yilmaz S, Erikel E, Yuzbasioglu D. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. *Drug and Chem Tox.* 2018, [in-press]. doi: 10.1080/01480545.2018.1499772.

## Capítulo 2 – Manuscrito 2

### *Cyclocybe cylindracea* as a producer of bioactive metabolites in submerged cultivation against pathogenic bacteria and yeasts

Liliane Poleto<sup>1,4</sup>, Leticia Osorio da Rosa<sup>1</sup>, Roselei Claudete Fontana<sup>1</sup>, Lucas Alves<sup>2</sup>, Eliseu Rodrigues<sup>2</sup>, Edina Poletto<sup>3</sup>, Guilherme Baldo<sup>3</sup>, Suelen Paesi<sup>4</sup>, Ceci Sales-Campos<sup>5</sup>, Marli Camassola<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Caxias do Sul - Institute of Biotechnology Laboratory of Enzymes and Biomass, Caxias do Sul - RS / Brazil 95070-560. Tel.: 55 54 3218-2149. E-mail: lpoletto@ucs.br; ticiaor@gmail.com, rfontana@ucs.br; mcamassola@gmail.com

<sup>2</sup> Federal University of Rio Grande do Sul - Institute of Food Science and Technology (ICTA), Porto Alegre - RS / Brazil 91501-970. Tel. : 55 51 3308-9786. E-mail: lucasalves.chef@gmail.com; eliseu.rodrigues@ufrgs.br

<sup>3</sup> Federal University of Rio Grande do Sul - Gene Therapy Center -Hospital of Clinics of Porto Alegre, Porto Alegre – RS/ Brazil 90035-903. E-mail : edinaoletto@gmail.com; gbaldo@hcpa.edu.br

<sup>4</sup> University of Caxias do Sul - Institute of Biotechnology Laboratory Molecular Diagnostic, Caxias do Sul - RS / Brazil 95070-560. Tel.: 55 54 3218-2149. E-mail: sopaesi@ucs.br

<sup>5</sup> National Institute of Research of the Amazon (INPA), Manaus - AM / Brazil 69011-970. Tel: 55 92 3643-3082. Email: ceci@inpa.gov.br

### Abstract

The basidiocarps of *Cyclocybe cylindracea* are characterised by their high nutritional value, but the antimicrobial bioactivities of submerged cultures of this mushroom have not been sufficiently studied. This work investigated the antimicrobial and cytotoxic activity of two types of extracts prepared using *C. cylindracea* developed in submerged cultivations, either in flasks (EF) or in bioreactors (EB). The antimicrobial activity was evaluated by disc diffusion assays and microbial growth inhibition. The metabolic profile of the extracts was assessed under the different conditions; compounds identified: 3-(1H-imidazol-5-yl)-2-(pyroglutamoylamino) propionic acid, 1-(2-ammonioacetyl) pyrrolidine-2-carboxylate and compound 246275, described for the first time *C. cylindracea*. The EF extract showed higher antimicrobial activity than the amoxicillin control against *E. coli* OP50, while for yeast the inhibition was similar to commercial antifungal drugs. These data demonstrate the antimicrobial potential of the metabolites produced by *C. cylindracea* but with a faster, more economical cultivation and more controllable method than basidiocarps cultivation.

**Keywords:** mushroom; antimicrobial agents; cytotoxic; submerged cultivation; biopharmaceuticals.

## Introduction

Antibiotics are compounds that inhibit the development of bacteria and fungi that are important in human and animal health [1]. Annually, around 100.000 tons of antibiotics are produced [2]. Since the 2000s, few new antibiotics have reached the market [3]. Faced with the problem of resistant microorganisms, biotechnological research is needed to describe new antimicrobial compounds.

Mushrooms are promising sources of secondary metabolites with bioactive properties, which can be used as a strategy for controlling microbial growth [4]. Metabolites vary according to the cultivation methods for each fungus and are produced naturally as a survival feature [5, 6]. It is estimated that 78% of antimicrobials are natural products [7, 8]. The diversity of fungi and macrofungi offer large sources of natural antimicrobials [9].

The genus *Cyclocybe* includes *Agrocybe cylindracea* (DC: Fr.) Mre. [syn.] *Agrocybe aegerita* (Briganti) Singer, which is a globally distributed mushroom, much appreciated in Asia [10, 11]. Fruiting bodies are used in the treatment of hypertension, cancer, obesity and cardiovascular diseases [12, 13, 14]. The first work with this mushroom was reported in 1950, where researchers isolated the substance Agrocybin, which they described as being responsible for its antimicrobial potential [15].

Although Brazil has excellent potential for studying bioactive compounds derived from mushrooms, few studies have been carried out [16, 17, 18]. Therefore, the objective of this work was to evaluate antibiosis against Gram-positive and Gram-negative pathogens, as well as yeasts of the genus *Candida*, and to verify the cytotoxic potential of the extracellular metabolites present in *C. cylindracea* cultures. Complementarily, the major compounds present in the extract obtained from the submerged culture of *C. cylindracea* were identified.

## Material and Methods

### 2.1 Strains

The fungal strain *C. cylindracea* VE66 (HUCS/MIUCS 1981) used in this work was collected in Torres-Rio Grande do Sul, Brazil and was deposited in the collection of fungi at the Laboratory of Enzymes and Biomass, University of Caxias do Sul (UCS). As

target microorganisms, five strains of Gram-positive bacteria, seven Gram-negative bacterial strains and two yeast strains of the genus *Candida* were used (Table 1). All bacterial and yeast strains were donated by FIOCRUZ (Oswaldo Cruz Foundation).

## 2.2 Molecular identification

DNA extraction for identification of VE66 isolate was performed using the commercial *PowerSoil*<sup>®</sup> *DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, Inc.). DNA amplifications were performed by polymerase chain reaction (PCR) with the *Phusion High-Fidelity*<sup>™</sup> *PCR kit* (Finnzymes). The primers used were ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') [19]. For the purification of the sample, the enzymes exonuclease I (Amersham Bioscience 2500U) and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Bioscience 5000U) were used. The sample was sequenced on an ABI-PRISM 3130xl automated sequencer (Applied Biosystems, USA).

## 2.3 Culture media

The *C. cylindracea* strain was maintained in medium containing 20 g.L<sup>-1</sup> wheat bran; 20 g.L<sup>-1</sup> sawdust of *Pinus* sp.; 2 g.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>; 20 g.L<sup>-1</sup> agar. After peal, the plates were incubated at 28°C for between 7 and 10 days, and thereafter stored at 4°C.

For the production of the extracts, which were evaluated for antimicrobial activity, a nutrient broth supplemented with 10 g.L<sup>-1</sup> of glucose was used. The growth of bacterial strains, as well as disc diffusion tests, were performed using nutrient agar (*Kasvi*<sup>®</sup>). Sabouraud agar medium (*Kasvi*<sup>®</sup>) was used for the yeasts. All culture media were autoclaved at 121°C for 20 min at 1 atm.

## 2.4 Cultivation *Cyclocybe cylindracea* for the production of extracts

500 mL-Erlenmeyer flasks containing 100 mL of broth (nutrient broth supplemented with glucose) were used. Each flask was inoculated with three 1.5 cm disks of *C. cylindracea*. The flasks were maintained at 28°C under reciprocal shaking at 180 rpm for different culture times (1 to 9 days) in order to determine at which point of fungal growth there is increased production of antimicrobials. Triplicates were prepared for each culture time point.



In a bioreactor, a pre-inoculum was made at 5% (w/v) containing nutrient broth and glucose. The flasks were inoculated as previously described and cultured with reciprocal shaking of 180 rpm for 24 h at 28°C.

The assays were performed in a stirred tank bioreactor (New Brunswick®, BioFlo®/Cellingen®115 model) using a working volume of 10 L. Nutrient broth supplemented with glucose was used in bioreactor cultures. Cultivation was maintained for 9 days at 28°C with agitation at 200 – 400 rpm, aeration rate of 0.5– 2 vvm, and without pH control, although this parameter was analysed daily. The oxygen dissolved in the broth was maintained at values greater than 30% saturation. A 300 mL sample was collected daily and frozen at -80°C to produce the extracts.

### 2.5 Preparation of extracts

At each culture time point, for both EF and EB (5, 7, 8 and 9 days), the broth was collected and centrifuged (3220 g, 20 min at 4°C). Then, the supernatant was lyophilised to concentrate the metabolites. A known concentration (100 mg.mL<sup>-1</sup>) of lyophilised extract was dissolved in sterile distilled water and filtered through a 0.22 µm pore filter and then used for testing.

### 2.6 Evaluation of the antimicrobial activity of the extract

#### 2.6.1 Disk diffusion

Volumes of 15 µL (100 mg.L<sup>-1</sup>) of the extracts were distributed on sterile filter paper discs with a diameter 5 mm and density of 250 g.m<sup>-2</sup>. The negative control was prepared using 15 µL of sterile water, the solvent used to dilute the extract. These disks were dried under the flow of the laminar flow hood, and the disks were used to perform the antimicrobial sensitivity test.

Cultures of the microorganisms were grown in nutrient broth overnight, and the concentration was standardised at 10<sup>8</sup> cells.mL<sup>-1</sup>. With the aid of a sterile swab, each culture was distributed over the nutrient agar medium. Disks containing the extract of *F. oxysporum* were distributed on the inoculated microorganisms. The plates were maintained at 37°C for 24 h. Inhibition of microbial growth was assessed by measuring the halo of growth inhibition (mm). The positive control was prepared using commercial antibiograms (*Sensifar*®), containing amoxicillin (10 µg) for bacteria and fluconazole (32 µg) for yeast. The tests were performed in duplicate.

**Table 1.** Diameter of the inhibition halo (mm), including 5 mm of the disc, obtained by agar diffusion test, using the *Cyclocybe cylindracea* culture extract produced by flask (EF) and in bioreactor (EB).

Microorganism	Inhibition halo(mm)*									
	5 days		7 days		8 days		9 days		Control	
	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	Positive**	Negative
<b>Gram-negative</b>										
<i>E. coli</i> OP50	-	11.1±1.3 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>b</sup>	13.8±0.7 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>b</sup>	13.0±0.7 <sup>a</sup>	7.0±1.6 <sup>b</sup>	14.3±0.8 <sup>a</sup>	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	-	7.0±0.0 <sup>a</sup>	-	-	-	-	10.6±0.7 <sup>a</sup>	-	17.5±2.1 <sup>b</sup>	-
<i>E. coli</i> ATCC 15669	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0±0.0 <sup>a</sup>	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19429	-	-	-	-	-	-	7.0±0.0 <sup>a</sup>	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 1705	-	-	-	-	-	-	-	-	10.5±0.7 <sup>a</sup>	-
<i>A. baumannii</i> (CT) ATCC 1906	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	8.0±1.4 <sup>a</sup>	-	7.5±2.1 <sup>a</sup>	-	8.0±2.8 <sup>a</sup>	-	7.5±0.7 <sup>a</sup>	-	24.0±0.0 <sup>b</sup>	-
<b>Gram-positive</b>										
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	15.5±7.7 <sup>a</sup>	-
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 33592	9.0±1.4 <sup>a</sup>	-	6.5±0.7 <sup>a</sup>	-	7.0±1.4 <sup>a</sup>	-	6.5±0.7 <sup>a</sup>	-	11.5±2.1 <sup>a</sup>	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	8.0±1.4 <sup>a</sup>	-	-	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>	-	8.0±2.8 <sup>a</sup>	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19429	-	-	-	-	-	-	7.0±0.0 <sup>a</sup>	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>	-
<b>Yeast</b>										
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	8.5±2.1 <sup>a</sup>	-	-	-	6.5±0.7 <sup>a</sup>	-	-	-	12.5±0.5 <sup>b</sup>	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	8.0±0.0 <sup>a</sup>	-	6.0±0.0 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>	8.5±3.5 <sup>a</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	-	-	9.0±1.0 <sup>a</sup>	-

(-) resistant (no formation of inhibition halo). Measurements of halos include 5 mm of disk.

\* Measured after 24 h of incubation at 37°C. Measures of duplicates and estimation of standard deviation. Statistical analysis between the production of the bottle extract and in the bioreactor. Values indicated with the same letter do not differ significantly ( $p < 0.05$ ), statistical analysis with ANOVA and Student's t-test.

\*\* Amoxicillin (10 µg) was the positive control for bacteria, and fluconazole (32 µg) was used for yeast.

### 2. 6.3 Microbial growth inhibition

Microbial growth inhibition determination was performed with the extract concentration ranging from 100 to 3.1 mg.mL<sup>-1</sup>. For the determination of microbial growth inhibition, a methodology described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [20] and Elshikh et al. (2016) [21] was used with some modifications due to dark color of the extract that made it difficult to read absorbance. These modifications consisted of centrifuging the plates (3220 g, 20 min at 4 ° C) and the supernatant was removed, adding 300 µl of saline solution (0.9%) to each well. The procedure was repeated until complete washing of the microbial cells.

The positive control was performed only with the bacterial culture and 245 µL of water. After 24 h, the absorbance was read at 560 nm. The percent inhibition was calculated according to Equation 1.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(100 - \text{Absorbance of the sample})}{\text{Absorbance of the control well}} \times 100 \quad \text{Equation (1)}$$

### 2.7 Cell viability assay

The extract toxicity was evaluated in human cell lines, HEK-293 (embryonic kidney ATCC®CRL-1573™) and SH-SY5Y (neuroblastoma ATCC®CRL- 2266™). Cell viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, USB Corporation, Cleveland, USA) assay. Cells were cultivated in DMEM containing 10% fetal bovine serum and 1% ampicillin/streptomycin, and seeded at a density of 1 × 10<sup>4</sup> cells/well in a 96-well plate. The cells were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h before the assay. Increasing volumes of the extracts (3.1 to 100 mg.mL<sup>-1</sup>) were incubated with the cells for 24 h, then the medium was removed and a 5 mg.mL<sup>-1</sup> MTT solution was added. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 4 h. After that, 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Synth Solutions, São Paulo, Brazil) were added to dissolve the blue formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm using a plate reader (Anthos, Hamburg, GER) after adjusting the pH with Sorensen's glycine buffer. Cells incubated only in DMEM were used as a control for 100% cellular viability, while 0% cellular viability was obtained after incubation of cells with Triton X-100 (2%, w/v) [22]. The control was done using sterile distilled water, in the same dilutions of the extracts. The tests were performed in triplicate.

### 2.8 Identification of metabolites

The extract was dissolved (100 mg.mL<sup>-1</sup>) and semi-purified by solid phase extraction (SPE). Strata cartridges (Phenomenex®) were activated with 2 mL of methanol and conditioned with 12 mL of aqueous solution acidified with 0.01% HCl. Then, 2 mL of extract was added to the cartridge. The cartridges were washed with 12 mL of aqueous solution acidified with 0.01% HCl to remove interfering compounds, sugars, and other high molecular weight molecules. The metabolites were eluted with 1800 µL of methanol with 2% formic acid and stored in amber tubes at -20°C until analysis. Prior to HPLC injection, the samples were evaporated on a rotary evaporator and the residue obtained was reconstituted with acidified water (0.5% formic acid) to 1 mL and filtered through a cellulose acetate membrane (0.22 µm).

A Shimadzu HPLC apparatus equipped with two pumps (LC-20AD), an online degasser (DGU-20A), an automatic injector (SIL20AHT), an oven (CTO-20A) connected in series to a DAD detector (SPD-M20A), and a mass spectrometer (MS) with a quadrupole-time of flight analyser and an electrospray ionisation source (ESI) from Bruker Daltonics (micrOTOF-Q II model) was used to identify the metabolites.

The compounds were separated on a Discovery® Supelco® C<sub>18</sub> column (5 µm, 15 cm × 4.6 mm), using as the mobile phase a linear gradient of water/0.5% formic acid (solvent A) and acetonitrile/0.5% formic acid (solvent B), at a flow rate of 0.7 mL.min<sup>-1</sup> and a column temperature of 29°C [23]. The spectra were obtained between 200 and 600 nm and the chromatograms processed at 271 nm. The mass spectra were acquired with a scan range of *m/z* 100 to 1000; and the MS parameters were as follows: ESI source in positive ionisation mode; capillary voltage: 3000 V, end plate offset: -500 V, drying gas temperature (N<sub>2</sub>): 310°C, flow: 8 L.min<sup>-1</sup>, nebuliser: 30 psi, and MS/MS fragmentation in automatic mode. Analysis of the chromatograms and mass spectra was done using DataAnalysis software 4.2. For the analyzes were ignored the compounds initially present in the culture medium.

### 2.9 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism 6, using the analysis of variance (ANOVA), after which the Student's t-test was applied with *p* <0.05.

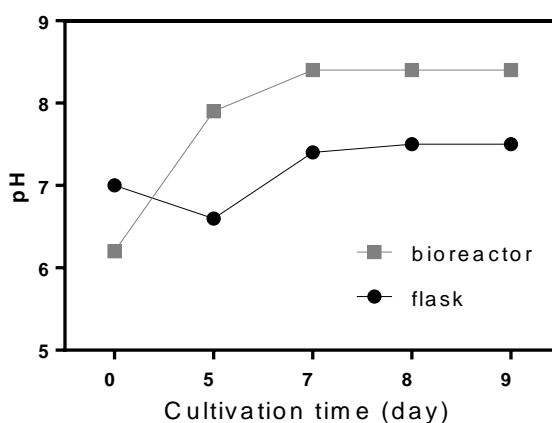
## Results

### 3.1 Molecular identification of the fungus

After DNA sequencing, the VE66 isolate was identified with 99.7% identity as *Cyclocybe cylindracea* complex (*Agrocybe aegerita*, FN 397955.1) (deposit number MK 791243). The species *A. cylindracea* and *A. aegerita* are included in *Cyclocybe cylindracea* complex [10].

### 3.2 Antimicrobial evaluation

The extract showed antibiotic activity against some Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeast. As reported in Table 1, the activity varied according to the target microorganism, the culture time of the *C. cylindracea* culture used to prepare the extract, as well as how the culture was performed for the development of mycelia. These variations indicate the difference in the production and concentration of the metabolites produced. The flask cultivation kept under agitation were a limiting condition for microbial development, since it was not possible to control the concentration of dissolved oxygen and nutrients; these stressful condition may have interfered in the production of metabolites. Another limiting factor for the production of secondary metabolites is the pH, which differentiated the culture methods (Figure 1).



**Figure 1.** Variation of pH values in cultures of *C. cylindracea* for the production of extracts in cultures in flasks (EF) and in bioreactor (EB).

For Gram-negative strains, the largest inhibition halo was found for *E. coli* OP50 in the presence of EB after 9 days of *C. cylindracea* culture. For this strain, the amoxicillin control showed no inhibition halo. The same condition was not observed for Gram-positive strains, as the largest halos formed with the EF cultivation, demonstrating the

presence of different compounds or variable concentration in the extracts. *S. aureus* ATCC 33592 was more inhibited by the 5 day culture extract, but the results were lower than those presented by the positive control. The extracts were also effective against yeasts, especially *C. tropicalis*, with results close to the fluconazole control, but it should be noted that the extract was not purified.

Finally, the extracts were not efficient against *E. coli* ATCC 15669, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. aureus* ATCC 25923 and *B. cereus*, demonstrating the importance of antimicrobial experimentation employing several species and microbial strains, as well as the necessity for different substances for the control of microorganisms.

In order to standardise the remainder of the tests, the day 9 was determined as the ideal duration of cultivation, because it halos were present with both EF and EB. Therefore, the other tests were performed with the extract from day 9 of culture.

### 3.3 Microbial growth inhibition

For the microbial growth inhibition tests, it was not possible to read the absorbance for inocula of less than  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, this was observed in the observation of 90% inhibition of growth only for *E. coli* OP50, as shown in Table 2. The lower inhibition of the other microorganisms may be related to high microbial load. The growth of *P. aeruginosa* was not inhibited by the extract, demonstrating that the diffusion test represented only antagonism between microorganisms.

**Table 2.** Percentage of inhibition of microbial growth by different concentrations of *C. cylindracea* culture extracts prepared using flasks or bioreactors.

microorganism	growth inhibition (%)											
	extract concentration (mg.mL <sup>-1</sup> )											
	100		50		25		12.5		6.25		3.1	
	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB
<b>Gram-negative</b>												
<i>Escherichia coli</i> OP50	87	79	86	69	84	61	80	61	75	61	53	57
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	34	47	0	37	0	37	0	37	0	29	0	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 19429	0	37	0	19	0	31	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	71	70	70	69	51	67	43	52	21	42	13	42
<b>Gram-positive</b>												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	4	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	81	0	56	0	52	0	41	0	23	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10100	80	0	78	0	77	0	71	0	66	0	76	0
<b>Yeast</b>												
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	29	56	1	35	0	34	0	26	0	26	0	6
<i>Candida. tropicalis</i> ATCC 28707	39	79	0	39	0	29	0	266	0	0	0	0

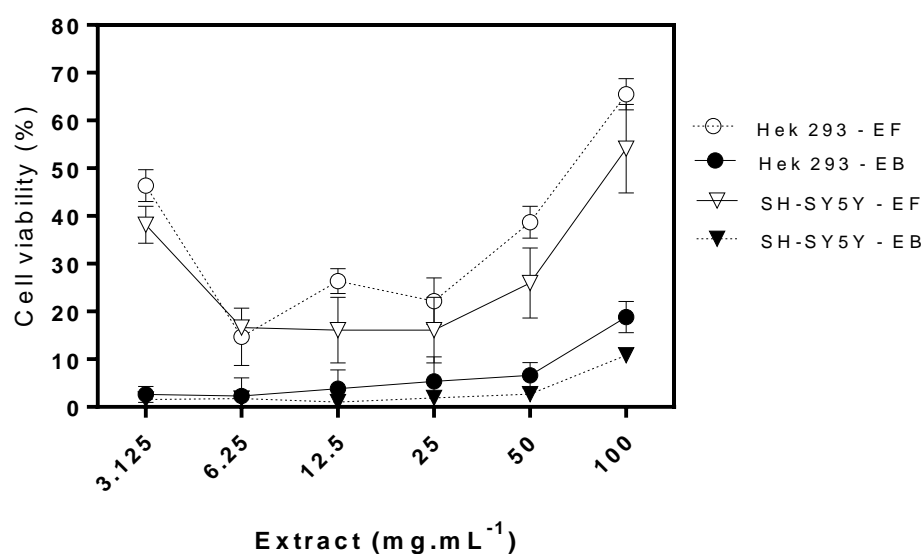
\*The results are expressed as the mean of triplicate samples.

When analysing the assays with the EF extract at the maximum concentration tested (100 mg.mL<sup>-1</sup>), the inhibition ranged from 70-80% for *E. coli* OP50, *P. mirabilis* and *S. epidermidis*. At the maximum concentration of EB extract tested, inhibition was 80% for *E. coli* and *C. tropicalis*. *S. aureus* ATCC 25923 showed resistance to the EB extract at all concentrations tested. Therefore, the percentage of inhibition varied according to the microorganism tested, the concentration and the type of extract.

### 3.4. Cell viability assay

The cell viability assay demonstrated that the addition of increasing amounts of extract increases cell viability, as shown in Figure 2. This situation can be explained by

the greater availability of nutrients present in the extract; since as the extract was not purified, there were substances remaining from the culture medium used for the development of the fungus. In addition, it was observed that, for both cell types, EB extract led to a lower number of viable cells, reaching a maximum of 20% viable HEK-293 cells at the maximum extract dose ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), whereas under the same conditions, the EF extract yielded 65% viable cells. The same behaviour was observed in the SH-SY5Y cell line, while the EF extract yielded 55% viable cells, the EB extract only 10%.

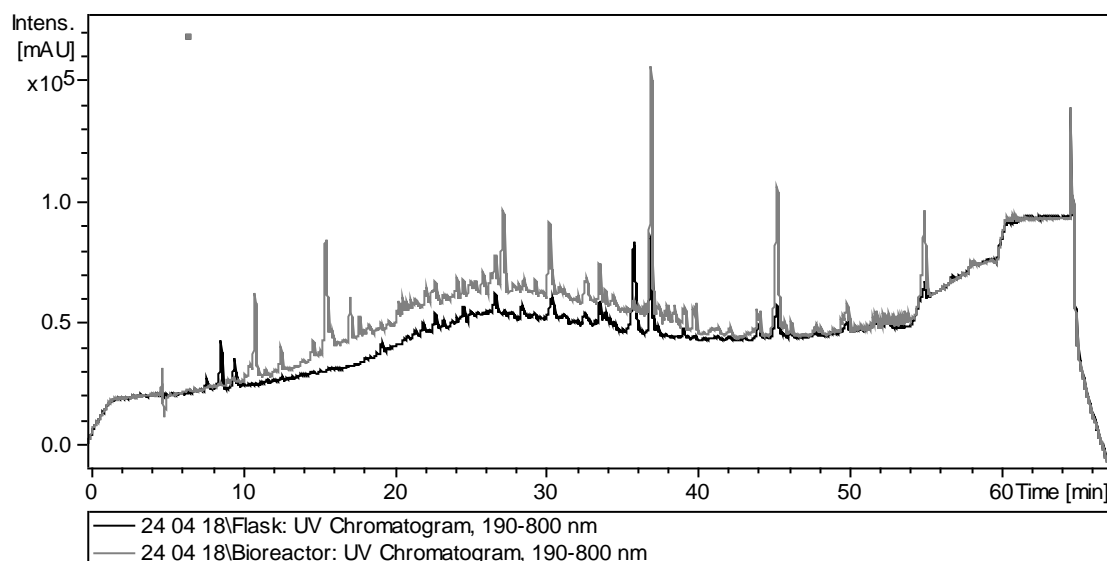


**Figure 2.** Cell viability (%) of HEK-293 and SH-SY5Y cells after treatment with extracts produced by *C. cylindracea* in submerged cultivation in flasks (EF) and in bioreactors (EB).

### 3.5. Identification of secondary metabolites

The EF and EB extracts presented the same chromatographic profile of major compounds, varying only in the concentration of the compounds (Figure 3). Identification was difficult due to the large amount of secondary metabolites present in the broth; in addition, databases for the comparison of the masses have a limited amount of information on compounds produced by mushrooms, especially *C. cylindracea*.





**Figure 3.** Chromatographic profile of the extracts of *C. cylindracea*. Grey line: EF extract, black line: EB extract.

It was possible to identify 40 compounds in the extracts prepared with the cultures of *C. cylindracea*, described in Table 3. However, some specific active compounds have not yet been identified due to lack of information in the databases. Among the identified compounds, some have antimicrobial activity, such as 7-hydroxycoumarin, while others are essential amino acids such as proline and valine. We identified for the first time secondary metabolites of *C. cylindracea*, i.e. (17) 3-(1H-imidazol-5-yl)-2-(pyroglutamoylamino)propionic acid, (18) 1-(2-ammonioacetyl)pyrrolidine-2-carboxylate and (28) compound 246275, for which we still lack information on its biological functions. In Table 2, the biological functions known for the substances for which their function was located in the literature are also available.

**Table 3.** Compounds identified in the culture broth (EF and EB- 9 days culture) of *C. cylindracea*, using chromatography, UV-Vis and mass spectroscopy.

Peak	Compound	t <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>b</sup>	Exact mass	[M+H] <sup>+</sup> (m/z) <sup>c</sup>	Median Absolute Mass Deviation (ppm)	MS/MS (+) (m/z) <sup>d</sup>	Biological functions
1	7-Hydroxycoumarin	3.5	n.d	162.0316	163.0429	-13.43	120.0222, 107.0464	Coumarin, antimicrobial activity
2	L-Prolin 1	3.7	n.d	115.0633	116.0705	0.09	100.0757, 98.0596	Aminoacid
3	Laminine	4.0	n.d	188.1524	189.1582	5.97	171.1455, 146.0562, 130.0865	Markers of fibrinogenesis
4	3-Methylhistidine	4.0	n.d	169.0851	170.0925	-0.75	153.0673 [M+H+NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 151.0464 [M+H+NH <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 125.0829 [M+H+N <sub>2</sub> HO] <sup>+</sup> , 124.0874 [M+H+CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 113.0608 [M+H+CH <sub>3</sub> N <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 109.0765 [M+H+NH <sub>3</sub> +CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 97.0725 [M+H+NH <sub>3</sub> +C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 96.0656 [M+H+NH <sub>3</sub> +C <sub>2</sub> HO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	Peptide bond synthesis and methylation of actin and myosin,
5	N-Acetylspermidine	4.0	n.d	187.1684	188.1741	8.65	171.1479, 144.1353, 143.1154, 139.1201, 124.0773, 117.1055, 116.0783, 115.09, 114.0904, 113.1171, 99.0445, 97.0258	Polyamine, ubiquitously in organisms and have important functions in the stabilization of cell membranes, biosynthesis of informing molecules, cell growth and differentiation, as well as adaptation to osmotic, ionic, pH and thermal stress.
6	Pyroglutamic acid	4.1	n.d	129.0425	130.0495	0.99	114.0576, 102.0549	Uncommon amino acid, in animals, elevated blood levels may be associated with problems of glutamine or glutathionem etabolism.
7	L-Glutamine	4.1	n.d	146.0691	147.0751	1.84	130.0502, 110.0700, 102.0547, 101.0710, 100.0755,	Non-essential amino acid

8	(S)-4-Amino-5-oxo-pentanoic acid	4.2	n.d	131.0582	132.0644	8.49	130.0484, 116.0711, 114.0546, 102.0554, 98.0225, 95.0112	Monocarboxylic acid, has a role as an <i>Escherichia coli</i> metabolite
9	Hercynine	4.2	n.d	198.1242	198.1220	5.39	163.0612, 154.1327, 147.0336, 127.0414, 139.0513, 136.0739, 130.0858, 122.0714, 129.0998, 124.1113, 112.0533, 111.0566, 110.0689, 95.0599	Amino-acid betaine
10	4-Methylene-L-glutamine	4.3		158.0691	159.0755	11.40	144.0639, 127.0469, 116.0712, 113.0717, 109.0257, 98.0695	Non-proteinogenic L-alpha-amino acid
	L-Citrulline	4.4		175.0956	176.1012	9.77	n.d	Non-essential amino acid synthesized in the urea cycle
11	5'-Deoxy-5'-(3-aminopiperidin-2-one-6-yl)adenosine	4.5	n.d	363.1655	364.1694	9.21	346.1617, 328.1488, 250.1486, 249.1453, 247.1300, 231.1350, 229.1230, 219.1387, 213.1243, 203.1398	Antibiotic
12	NG,NG-Dimethyl-L-arginine	4.6		202.1429	203.1480	0.89	175.1479, 161.1316, 158.1259, 147.1161, 145.0998, 133.0989, 131.0834, 119.0843, 109.1020, 107.0847, 105.0865	Metabolic by-product of continual protein modification processes in the cytoplasm of all human cells (and now in fungi)
13	Deoxyguanidinoproclavaminic acid	4.6		228.1222	229.1270	9.19	183.1111, 181.0983, 171.1109, 169.0960, 155.1166, 132.1002, 120.0755, 118.0846, 117.0733, 116.0706	a beta-lactam
14	L-Prolin 2	4.7		115.0633	116.0707	0.09	100.0757, 98.0596	Aminoacid
15	L-Valine	4.7		117.0789	118.0856	2.37	116.0705, 103.0625, 102.0526, 101.0600, 100.0746	Aminoacid
16	Desmethylpyrrolysine	5.5		241.1426	242.1474	2.07	225.1215, 197.1269, 141.0659, 129.1019, 112.0763	Aminoacid
17	3-(1H-imidazol-5-yl)-2-(pyroglutamoylamino)propionic acid	5.6		266.1015	267.1051	4.63	221.1013, 203.0771, 156.0760	*
18	1-(2-ammonioacetyl)pyrrolidine-2-carboxylate	5.9		172.0847	173.0901	6.60	155.0831, 127.0853, 116.0709, 114.0516, 112.0751, 99.0516	*
19	Imidazolylpropionic acid	6.0		140.0585	141.0643	10.55	125.0694, 123.0549, 102.0577, 97.0732, 95.0605	Product of <u>histidine</u> metabolism,

20	L-Prolin 3	6.1		115.0633	116.0702	1.61	101.0597	Aminoacid
21	Histidylleucine	6.4		268.1535	269.1572	1.03	251.1466, 223.1537, 207.1245, 205.1472, 199.1077, 184.1079, 181.0991, 156.0767, 150.0894, 138.0656, 130.0959, 122.0714, 110.0715, 102.0528	Dipeptide, has a role as a metabolite.
22	Urocanic acid	6.7		138.0429	139.0494	-3.14	124.0381, 121.0400, 111.0569, 109.0547, 97.0401, 95.0589	May be both a UV protectant and an immunoregulator
23	Arginylpyroglutamate	6.8		285.1437	286.1486	5.12	269.1220, 252.0978, 251.1114, 244.1272, 241.1262, 226.1150, 170.0945, 198.1222, 175.1199	
24	gamma-Glutamyl-gamma-aminobutyraldehyde	7.0		216.1110	217.1168	-5.20	171.1150, 159.1153, 145.0999, 133.1005	<u>L-glutamine</u> derivative, has a role as an <i>Escherichia coli</i> metabolite
25	1-Methyladenine	7.7		149.0701	150.0768	-5.02	135.0556, 134.0485, 133.494, 109.0514	Product of alkylation damage in DNA which can be repaired by damage reversal by oxidative demethylation
26	Acetaminophen			151.0633	152.0700	-0.14	134.0594, 110.0575, 109.0524, 107.0492	Weak anti-inflammatory properties and is used as a common analgesic, but may cause liver, blood cell, and kidney damage.
27	5-Indolol	8.1		133.0527	134.0599	-1.58	133.0504, 118.0656, 117.0574, 107.0493, 106.0685, 103.0569	It has a role as a human metabolite.
28	Compound 246275	8.3		157.0851	158.0915	7.55	141.0663, 139.0529, 130.0621, 116.0715	
29	Antibiotic UK 2A	8.6	280	514.1951	515.2015	1.57	259.1085, 189.0813, 145.0525, 114.0544, 112.0503	Antifungal, is an antifungal antibiotic produced by <i>Streptomyces</i>
30	(+)(N1,N8-diacetylspermidine (3Z,6E,8E)-N-(4-acetamido-3-hydroxybutyl)-2-hydroxy-4,8-dimethylundeca-3,6,8-trienamide	8.7		230.1868	230.1838	1.05	187.1460	Indicator of neoplastic diseases.
31		8.7		352.2362	353.2402	2.34	336.2131, 282.1655, 264.1570, 247.1311	

32	2,2-dideuterio-2-(2,2,3,3,4,4-hexadeuterio-5-oxopyrrolidin-1-yl)acetamide	8.9	142.0742	143.0805	6.45	142.0746, 127.0486, 126.0544, 115.0853, 110.0468, 100.0650	
33	Blastmycetin F	9.8	396.2161	397.2275	3.65	379.2168, 358.1993, 282.1666	In vivo tumor promoter
34	Antibiotic X 1092	10.4	244.1423	245.1472	4.92		
35	Cycloheximide	11.0	281.1627	282.1659	9.35	265.1458, 264.1562, 247.1306	Used as a fungicide and as a anticancer drug.
36	(4-methylphenyl)-[4-[4-nitro-3-(3-pyridinylmethylamino) phenyl]-1-piperazinyl] methanone	11.5	431.1957	432.2015	1.64	147.0752	
37	1-[(1S)-1-(hydroxymethyl)-7-methoxy-9-methyl-1'-[4-oxanyl(oxo)methyl]-2-spiro[1,3-dihydropyrido[3,4-b]indole-4,4'-piperidine]yl]ethenone	11.6	469.2576	470.2646	4.49	454.2439, 453.2338, 171.1139, 143.1178	
38	N-Acetyl-O-demethylpuromycin	11.9	499.2179	500.2248	0.77	250.1405, 247.1296, 249.1438, 231.1336	
39	Discadenine	12.0	304.1647	305.1675	0.11	251.1485, 129.1011, 116.0709	
40	Allantoic acid	12.3	176.0545	177.0612	3.31	130.0635, 117.0537	Involved in purine metabolism

## Discussion

This is the first work to describe the antimicrobial and cytotoxic activity of the filtrate of *C. cylindracea* broth, although previous studies have assessed the activities of extracts obtained from the mycelia or fruiting body of this mushroom [24,25]. The first study on the control of microorganisms with the genus *Cyclocybe* (*Agrocybe*), demonstrated an antifungal effect against *Candida krusei* [26], as verified in this work for other species of *Candida*, indicating the strong potential for the exploitation of fungal metabolites of the genus *C. cylindracea*. There is currently an urgent need to obtain new antifungal agents, since all the antifungals currently marketed also present nephro- and hepatotoxicity. The search for new substances may enable the identification of substances with less toxic potential to animals, including humans, that are affected by mycoses.

The two forms of cultivation in which the assays were conducted, i.e. EF and EB, demonstrated different results regarding microbial inhibition. The difference was related to the concentration of the compounds in the culture medium, corroborating the findings of Brizuela et al. [5] and Shen et al. [27], who stated that secondary metabolites vary according to the method of cultivation and the available carbon source, even for the same fungal isolate.

The pH was another important factor in the formation of secondary metabolites, different fungal morphologies require different pH levels for the formation of biomass and consequently of metabolites. The highest antimicrobial activity was obtained by maintaining the fungal cultures at an acidic pH [12]. It was observed that the culture in flasks maintained at a pH below 7 seems to have favoured the production of antimicrobial metabolites. Cultivation in bioreactors led to a pH level around 8. Few studies have used submerged cultivation for the production of macrofungi with antimicrobial potential. Most of the studies available in the scientific literature used extracts produced from basidiomas or ascomas (breeding structures); therefore, it is interesting to study the optimisation of culture parameters for each isolate and for each culture method to be used, in order to maximise the production of primary and secondary metabolites [12].

The extracts showed activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results for extracts produced in submerged cultivation are similar to those obtained by Kumar et al. [28], using polysaccharides extracted from edible *Agrocybe cylindracea* mushrooms; however, the production of metabolites in submerged cultivation requires less time.

Among the microorganisms commonly reported as being inhibited by extracts from the *Agrocybe cylindracea* mushroom are *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Shigella* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. [27, 28]. The antimicrobial potential in the literature is related to the presence of phenolic compounds [29, 30, 31]; gallic acid, catechin, epicatechin and rosmarinic acid have been described [29, 30]. These compounds are generally isolated from the fruiting body and not from the broth [25], which may explain the differences found in this work, since none of the previously mentioned compounds were found.

Another compound not found in the extract was described by Ngai et al. [31], i.e. agrocibin, which was to be inactive against bacteria but with antifungal action. It is worth noting that crop times for submerged cultivations are much shorter in relation to the time used for the production of basidiomas, which may not have allowed the production of Agrocibin. Alternatively, this compound may be produced only during the fruiting stage of *C. cylindracea*.

Several studies report the benefits of mushroom extracts, with anti-metastatic, immunomodulatory, hypotensive and antitumor activity due to the large amount of lectins [32]. Toxicity studies are usually related to tumour cells, necessitating the improvement of studies on healthy cells. Some studies are contradictory since Jin et al. [13] described the toxic effect of lectins on liver cells. In the study by Jin et al. [13], the lectins present in the mushroom were extracted with water with a lethal dose of  $8.77 \text{ g.kg}^{-1}$  in tests on mice. A lower daily dose of galactin than that previously described, i.e.  $0.75 \text{ mg.kg}^{-1}$ , isolated from this mushroom, was able to inhibit metastatic activity in mice [32]. Sadi et al. [30] studied the toxicity of different extracts of *A. modesta* in HepG2 cells following 48 hours of exposure to the extract. They described the aqueous extract as being more cytotoxic ( $\text{IC}_{50} = 7.641 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) when compared to the methanolic extract ( $\text{IC}_{50} = 69.3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). The extracts from this study had a cytotoxic effect on HEK-293 and SH-SY5Y cells. Treatment with the EB extract showed greater cytotoxicity. The difference between the treatments is related to impurities and the concentrations of the metabolites in the crude extracts, as well as to the pH of the EF extract, which was close to neutrality. Therefore, although mushrooms are indicated as nutraceutical foods [28], it is necessary to evaluate their toxicity, since this may be variable according to the methods used for cultivation and deriving the compounds of interest [13].

## Conclusions

The crude extracts from the submerged culture of *C. cylindracea* showed variable antimicrobial action according to the microorganism and the method of culture, demonstrating its potential for the production of antimicrobial metabolites, especially for topical use. To our knowledge, this is the first report showing an antibiotic effect of metabolites produced in submerged cultivation by *C. cylindracea*. Thus, due to the increasing need for the development of new antimicrobial agents, the compounds identified in this work should be studied separately for the constitution of new drugs or antimicrobial agents, as well as other forms of culture to maximise the production of compounds of interest.

## Acknowledgment

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 472153/2013-7 and 310255/2012-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 16/2551-0000246-0), and Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES3255/2013).

## References

- [1] Granny, P.; Ancona, V.; Caracciolo, A.B. (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem J*, 136: 25-39. doi:10.1016/j.microc.2017.02.006
- [2] Seiber, J.; Kramer, A.; Laber, A.; Tadesmir, D. (2016) From Discovery to Production: Biotechnology of Marine Fungi for the Production of New Antibiotics. *Mar Drugs*, 14: 1-20. doi:10.3390/md14070137
- [3] Guimarães, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M.T. (2010) Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of news agents. *Quím Nova*, 33: 667-669. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>
- [4] Jing, H.; Zhang, Q.; Liu, M.; Zhang, J.; Zhang, C.; Li, S.; Ren, Z.; Gao, Z.; Liu, X.; Jia, L. (2018) Polysaccharides with Antioxidant and Antiaging Activities from



- Enzymatic –Extractable Mycelium by *Agrocybe aegerita* (Bring.) Sing. Evid Based Complement Alternat Med, 1: 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/1584647>
- [5] Brizuela, M.A; Garcia, L; Pérez, L; Mansur, M. (1998) Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários. Rev. Iberoam. de Micol., 15: 69-79.
- [6] Calo, J.R; Crandall, P.G; O'Bryan, C.A; Ricke, S.C.(2015) Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. Food Control, 54: 111-119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- [7] Kumar, C.G; Mongolla, P; Joseph, J; Nageswar, Y.V.D; Kamal, A. (2010) Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, Índia. J. Mycol. Médic., 20:283-289. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.08.002>
- [8] Khan, A.A; Bacha, N; Ahmad, B; Lutfullah, G; Farooq, U; Cox, R.J. (2014) Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 4: 859-870. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230>
- [9] Ren, L; Hemar, Y; Perera, C.O; Lewis, G; Krissansen, G.W; Buchanan, P.K. (2014) Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extract of eight edible mushrooms. Bioact. Carb. and Diet. Fibre, 3: 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.003>
- [10] Vizzini, A; Angelini, C; Ercole, E. (2014) Le sezioni velatae e aporus di *Agrocybe* sottogenere *aporus*: rivalutazione del genere *Cyclocybe* velen. Ed una nuova specie. RMR, 30: 21-38
- [11] Tsai, S Y; Huang, S J; Mau, J L. (2006) Antioxidat properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. Food Chem., 98: 670-677. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.003>
- [12] Kim, H.O; Lim, J.M; Joo, J.H; Kim, S.W; Hwang, H.J; Choi J.W; Yun, J.W. (2005) Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. Bioresour. Technol., 96: 1175-1182. DOI:10.1016/j.biortech.2004.09.021
- [13] Jin, Y; Che, T; Yin, Y; Yu, G; Yang, Q; Liu, W; Ye, X; Yu, W; Alok, S; Chen, Y; Wong, B.H.C; Cheng, P; Sun, H. (2014) Lethal protein in mass consumption edible mushroom *Agrocybe aegerita* linked to strong hepatic toxicity. Toxicon, 90: 273-285. DOI:10.1016/j.toxicon.2014.08.066

- [14] Rathore, H; Prasad, S; Kapri, M. Tiwari, A; Sharma, S. (2019). Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. *J Funct Foods*, 56: 182-193. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.016>
- [15] Kavanagh, F; Hervey, A; Robbins, W.J. (1950). Antibiotic substances from basidiomycetes. VI. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 36: 102-106.
- [16] Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Resear.*, 95: 641-655. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)
- [17] Rosa, L.H; Machado, K.M.G; Jacob, C.C; Capellari, M; Rosa, C.A; Zan, C.L; (2003) Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 7: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000700019>
- [18] Rosenberger, M.G.; Paulert, R.; Cortez, V.G. (2018) Studies of the Antimicrobial Activity of Mushrooms (Agaricales) from South America (Review). *Int J Med Mushrooms*, 20: 1065-1074. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018028771
- [19] White T J, Bruns S L, Taylor J W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York.
- [20] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd informational supplement. M27–S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, Wayne, PA.
- [21] Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat I M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol. Lett.* 2016, 38: 1015-1019. DOI 10.1007/s10529-016-2079-2.
- [22] Schuh R, Poletto E, Fachei F N S, Matte U, Baldo G, Teixeira H F. (2018) Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide : Implications for CRISPR/Cas technology. *J. Colloid Interface Sci.*, 15: 243-55. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.06.058>
- [23] Rodrigues E, Mariutti L R B, Mercadante A. (2013) Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem.*, 61 : 3022-29. DOI:10.1021/jf3054214

- [24] Tsai, S.y; Tsai, H.L; Mau, J.L.(2008) Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chem.*, 107: 997-983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.080>
- [25] Lin, S; Ching, L.T; Lam, K, Cheung. (2017) Anti-angiogenic effect of water extract from the fruiting body of *Agrocybe aegerita*. *Food Sci. Technol.*, 75: 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.044>
- [26] Mavoungou, H; Porte, M; Oddoux, L. (1987). Activité antitumorale des mycéliums d'*Agrocybe dura*, *Mycoacia uda* et *Phanerochaete laevis*. *Ann Pharmaceutiques Françaises*, 45: 71-77.
- [27] Shen, H-S; Shao, S; Chen, J-C; Zhou, T. (2017) Antimicrobials from Mushrooms for Assuring Food Safety. *Com. Rev. Food Sci. Food Safety*, 16: 316-329. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12255>
- [28] Kumar, S.S.; Shankar, S.; Mohan, S.C. (2017) In vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polysaccharides Extract from Edible Mushrooms *Pleurotus florida* and *Agrocybe cylindracea*. *Singapore J Chem Biol*, 6: 17-22. DOI: 10.3923/sjchbio.2017.17.22
- [29] Sevindik, M.; Akgul, H.; Bal, C.; Selamoglu, Z. (2018) Phenolix Contents, Oxidant/Antioxadant Potencial and Heavy Metal Levels in *Cyclocybe cylindracea*. *Indian J Pharm Educ*, 52: 437-441. Doi:10.5530/ijiper.52.3.50
- [30] Sadi, G; Kaya, A; Yalcin, H.; Emsen, B; Kocabas, A; Kartal, D; Altay, A. 2016. Wild Edible Mushrooms from Turkey as Possible Anticancer Agents on HepG2 Cells Together with Their Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Int. J. Med. Mushrooms*, 18: 83-95. DOI:10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i1.100
- [31] Ngai, P.H.K; Zhao, Z.; Ng, T.B. (2005) Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 26: 191-196. DOI:10.1016/j.peptides.2004.09.011
- [32] Yang, Q; Yin, Y; Pan, Y; Ye, X; Xu, B; Yu, W; Zeng, H; Sun, H. (2018). Anti-metastatic activity of *Agrocybe aegerita* galectin (AAL) in a mouse model of breast cancer lung metastasis. *J Funct Foods*, 41: 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.058>

## Capítulo 3 – Manuscrito 3

### Antimicrobial properties of extracts containing metabolites of Amazonian mushrooms grown by submerged culture

Liliane Poletto<sup>1,4</sup>, Letícia Osório da Rosa<sup>1</sup>, Roselei Claudete Fontana<sup>1</sup>, Eliseu Rodrigues<sup>2</sup>, Edina Poletto<sup>3</sup>, Guilherme Baldo<sup>3</sup>, Suelen Paesi<sup>4</sup>, Ceci Sales-Campos<sup>5</sup>, Marli Camassola<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Caxias do Sul - Institute of Biotechnology Laboratory of Enzymes and Biomass, Caxias do Sul - RS / Brazil 95070-560. Tel.: 55 54 3218-2149. E-mail: lpoletto@ucs.br; ticiaor@gmail.com; rfontana@ucs.br; mcamassola@gmail.com

<sup>2</sup> Federal University of Rio Grande do Sul - Institute of Food Science and Technology (ICTA), Porto Alegre - RS / Brazil 91501-970. Tel. : 55 51 3308-9786. E-mail: eliseu.rodrigues@ufrgs.br

<sup>3</sup> Federal University of Rio Grande do Sul - Gene Therapy Center -Hospital of Clinics of Porto Alegre, Porto Alegre – RS/ Brazil 90035-903. E-mail : edinapoletto@gmail.com; gbaldo@hcpa.edu.br

<sup>4</sup> University of Caxias do Sul - Institute of Biotechnology Laboratory Molecular Diagnostic, Caxias do Sul - RS / Brazil 95070-560. Tel.: 55 54 3218-2149. E-mail: sopaesi@ucs.br

<sup>5</sup> National Institute of Research of the Amazon (INPA), Manaus - AM / Brazil 69011-970. Tel: 55 92 3643-3082. Email: ceci@inpa.gov.br

#### ABSTRACT

Amazonian fungi were selected whose extracts, when grown in submerged cultures, showed antimicrobial potential. After screening with antagonizing cultures, fungi that showed antimicrobial potential were grown in both flasks (FE) and a bioreactor (BE). The culture broths were filtered, concentrated and then resuspended for antimicrobial activity assays. Three of the 26 isolates tested showed antimicrobial activity, particularly one isolate of *Fomitopsis* sp., the extract of which following seven days of EB culture inhibited the growth of all microorganisms tested. The extract from *Fomitopsis* sp. culture showed superior antimicrobial activity to that of the amoxicillin control against *Escherichia coli* OP50, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Acinetobacter baumannii*. Due to the low pH of the *Fomitopsis* sp. extract, the extract was cytotoxic to human cells, Hek-293 and SH-Y5Y, at all concentrations tested. Among the isolates studied, fungi of the order Polyporales showed the greatest potential for the production of metabolites with antimicrobial potential.

**Keywords:** Fungicidal properties; *Candida*; Antimicrobial activity, *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; biopharmaceuticals

## INTRODUCTION

Macrofungi, popularly known as mushrooms, belong to the phylum Basidiomycota, have a fruiting body that can be hypogeous or epigeous. Besides being important sources of nutrients and bioactive compounds, they are capable of producing a series of secondary metabolites [1-5], which are extracellular compounds secreted in the culture medium during fungus growth. These secreted compounds can be isolated and characterised for industrial purposes, for example, in the production of enzymes and drugs [6]. Among these secondary metabolites, are antimicrobial compounds, produced naturally to allow the fungi to survive in the environment [7]. In some cases, mushrooms show higher antimicrobial activities than many antibiotic and antifungal agents used commercially [5].

Brazil is a large and ecologically diverse country, encompassing different biogeographic zones and biomes, making it rich in biodiversity [8]. Twenty percent of the world's biodiversity is concentrated in the Amazon rainforest [9]. Even so, the microbiological species present in the forest are still poorly studied and may represent a source of antimicrobial compounds.

The search for new antimicrobial agents is of fundamental importance, as bacteria have a high potential for genetic recombination, leading to an increase of drug and antimicrobial resistant strains. Given the diversity of Brazilian mushrooms, they represent likely new sources of antimicrobials, making the study of their metabolites valuable from this stand-point and in increasing knowledge of the biotechnological potential of these organisms. Generally, local and substrates where mushrooms grow affect the composition of these bodies and their bioactive properties. This variation may be related to growth conditions, genetic factors, geography and procedures during their analysis [10,11]. Therefore, culture conditions need to be standardised to optimise the production of bioactive compounds, including media composition and incubation procedures, such as agitation, oxygenation and pH. In this sense, submerged cultivation provides a unique combination of experimental flexibility and standardisation.

Amazonian fungi were selected whose extracts showed antimicrobial potential against pathogenic microorganisms and those that contaminate food. Active compounds from Amazonian fungal extracts may represent new antimicrobial agents, either as biopharmaceuticals or as alternative food preservatives.

## MATERIAL AND METHOD

### 2.1 Strains of microorganisms

During the summer of 2015, 26 fungal lines were collected from the Adolpho Ducke Forest Reserve, in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. Cultures are deposited at the National Institute of Amazonian Research Institute (INPA) and the mycelia used in this work were maintained at the Laboratory of Enzymes and Biomasses of the University of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. Five Gram-positive bacterial strains, six Gram-negative bacterial strains and two yeast strains of the genus *Candida* were also used in this study. All bacterial and yeast lines were kindly donated by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, and are listed in Table 1.

### 2.2 Culture media

The fungal strains were maintained in sawdust agar medium containing: 20g.L<sup>-1</sup> wheat bran; 20g.L<sup>-1</sup> sawdust of *Pinus* sp.; 2g.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>; 20g.L<sup>-1</sup> agar. Plates were incubated at 28°C for a period of 7-10 days, and thereafter stored at 4°C.

For the production of the extracts to be evaluated for their antimicrobial activity, nutrient broth supplemented with 10g.L<sup>-1</sup> glucose was used. Growth of bacterial strains, as well as disc diffusion tests, was performed using nutrient agar (Kasvi®). Sabouraud agar (Kasvi®) was used to grow yeasts. All culture media were autoclaved at 121°C for 20 min at 1 atm.

### 2.3 Molecular identification

DNA extraction for identification of isolates was performed using a PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.). DNA amplifications were performed by polymerase chain reaction (PCR) with a Phusion High-Fidelity™ PCR kit (Finnzymes). The primers used were ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') [12]. For purification of the sample, Exonuclease I (Amershan Bioscience, 2500U) and Shrimp Alkaline Phosphatase (Amershan Bioscience, 5000U) were used. PCR fragments were sequenced on an ABI-PRISM 3130xl automated sequencer (Applied Biosystems, USA).

### 2.4 Screening of macrofungi with antimicrobial potential

Initially, an antagonism test was performed between two microbial cultures. Strains of potential antimicrobial macrofungi were grown until they complete colonised

the Petri dishes containing sawdust agar medium. The microorganisms were grown in nutrient broth (bacteria) and Sabouraud broth (yeasts) for 24h. Standardised suspensions of microorganisms with an absorbance of 1.0 were inoculated with a sterile swab onto the surface of their respective culture medium.

Three 5mm diameter mycelial discs were inoculated onto the surface of the agar previously inoculated with the microorganisms. The plates were then kept in an oven at 28°C for 48h. Antagonistic activity was confirmed by the presence of an inhibition halo around the fungal disc. Only fungi that induced halos were selected for further study.

### *2.5 Cultivation of macrofungi in submerged cultivation in flasks*

Five hundred ml Erlenmeyer flasks containing 100 mL nutrient broth supplemented with 10g.L<sup>-1</sup> glucose were inoculated with three 1.5cm discs from the mushroom cultivation. The flasks were maintained at 28°C with reciprocal shaking at 180 rpm for different culture times (1 to 24 days), in order to determine at which point there was increased production of antimicrobials. Triplicate cultures were obtained for each time point (7, 12, 16, 20 and 24 days). For the remainder of the experiments, the extract of 7 days of cultivation was selected.

### *2.6 Cultivation of macrofungi in a bioreactor*

A pre-inoculum in nutrient broth and 10 g.L<sup>-1</sup> glucose was generated with a size of 5% (v/v). It was prepared in flasks, as described above and was incubated for 24 h at 28°C, with reciprocal shaking at 180 rpm.

Assays were performed in a BioFlo<sup>®</sup>/Cellingen<sup>®</sup> 115 stirred tank bioreactor (New Brunswick<sup>®</sup>), with a capacity of 14 L, with a working volume of 10 L. Cultivation in nutrient broth supplemented with glucose was maintained for nine days, with agitation of 200-400 rpm and an aeration rate (volume of air per volume of medium per minute, vvm) of 0.5-2. Cultures were maintained at 28°C without pH control, though this parameter was analysed daily. Oxygen dissolved in the broth was maintained at values above 30% of saturation. A 300 mL volume of culture was collected daily, centrifuged and lyophilized.

### *2.7 Preparation of extracts*

Extracts in submerged cultures were produced initially in flasks (FE), and after staging, as 10L production in the bioreactor (BE). At each culture time (1 stirred tank bioreactor 7 days), broth was collected and centrifuged (3220 × g for 20 min at 4°C), thus

separating mycelia from the culture medium. The supernatant was then lyophilized to concentrate the metabolites. The lyophilized extract was dissolved in sterile distilled water to 100 mg.mL<sup>-1</sup>, and filtered through a 0.22 µm filter for sterilization.

## 2.8 Evaluation of the antimicrobial activity of the extracts

### 2.8.1 Disc diffusion

Fifteen µL of 100 mg.mL<sup>-1</sup> extract were distributed on sterile filter paper discs of diameter 0.5cm and density 250 gm<sup>-2</sup>. Fifteen µL of sterile water, the solvent used to dilute the extract, was used as a negative control. The discs were dried in a laminar flow hood, and used to perform the antimicrobial sensitivity assays.

Cultures of microorganisms were grown in nutrient broth overnight, and their concentrations standardised to 10<sup>8</sup> cells.mL<sup>-1</sup>. With the aid of a sterile swab, each culture was distributed over nutrient agar medium. Discs containing extract were then placed on the plates inoculated with microorganisms, and these were incubated at 37°C for 24h. Inhibition of microbial growth was assessed by the width (mm) of the halo of growth inhibition. Positive controls used commercial antibiograms (Sensifar<sup>®</sup>), containing 10 µg amoxicillin for bacteria and 32 µg fluconazole for yeast. The tests were performed in duplicate.

### 2.8.2 Microbial growth inhibition

Microbial growth inhibition determination was performed with the extract concentration ranging from 100 to 3.1 mg.mL<sup>-1</sup>. For the determination of microbial growth inhibition, a methodology described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [13] and Elshikh et al. (2016) [14] was used with some modifications due to dark color of the extract that made it difficult to read absorbance. These modifications consisted of centrifuging the plates (3220 g, 20 min at 4 ° C) and the supernatant was removed, adding 300 µl of saline solution (0.9%) to each well. The procedure was repeated until complete washing of the microbial cells.

The positive control was performed only with the bacterial culture and 245 µL of water. After 24 h, the absorbance was read at 560 nm. The percent inhibition was calculated according to Equation 1.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(100 - \text{Absorbance of the sample})}{\text{Absorbance of the control well}} \times 100 \quad \text{Equation (1)}$$



### 2.9 Cell viability assay

Toxicity of the extracts was evaluated in human embryonic kidney 293 cells (HEK-293; ATCC®CRL-1573™) and a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y (ATCC®CRL-2266™). Cell viability was evaluated using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; USB Corporation, Cleveland, USA) assay. Cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% ampicillin/streptomycin, seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well in a 96-well plate. The cells were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours before the assay. Increasing concentrations of the extracts (3.1 to 100 mg.mL<sup>-1</sup>) were incubated with the cells for 24 hours, then the medium was removed and 5mg.mL<sup>-1</sup> MTT was added. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 4 hours. After incubation, 100 µL dimethyl sulfoxide (DMSO; Synth Solutions, São Paulo, Brazil) were added to dissolve the blue formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm using a plate reader (Anthos, Hamburg, GER) after adjusting the pH with Sorensen's glycine buffer. Cells incubated only in DMEM were used as a control of 100% cellular viability, while 0% cellular viability was obtained after incubation of cells with 2% (w/v) Triton X-100 [15].

### 2.10 Identification of the metabolites

The extracts dissolved at 100 mg.mL<sup>-1</sup> were semi-purified by solid phase extraction (SPE). Strata cartridges (Phenomenex®) were activated with 2 mL methanol and conditioned with 12 mL aqueous solution acidified with 0.01% HCl. Two mL of extract was added to the cartridge, which were then washed with 12 mL aqueous solution acidified with 0.01% HCl to remove potentially interfering compounds, such as sugars, and other high molecular weight molecules. The metabolites were finally eluted with 1800 µL methanol, 2% formic acid and stored in amber tubes at -20 °C. Prior to HPLC injection, the samples were evaporated on a rotary evaporator, and the residue obtained was reconstituted with acidified water (0.5% formic acid) to 1 mL and filtered through a 0.22 µm cellulose acetate membrane.

To identify the metabolites, the extracts were analysed on a Shimadzu HPLC apparatus equipped with two pumps (LC-20AD), online degasser (DGU-20A), automatic injector (SIL20AHT) and oven (CTO-20A) connected in series to a DAD detector (SPD-M20A), and a Bruker Daltonics micrOTOF-Q II mass spectrometer (MS), with quadrupole-time of fly analyser and an electrospray ionisation source (ESI), .

The compounds were separated on a Discovery<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column (5µm, 15 cm × 4.6 mm; Supelco<sup>®</sup>), using as the mobile phase a linear gradient of water/0.5% formic acid (solvent A) and acetonitrile/0.5% formic acid (solvent B), at a flow rate of 0.7 mL.min<sup>-1</sup> and a column temperature of 29 °C [16]. The spectra were obtained between 200 and 600 nm and the chromatograms processed at 271 nm. The mass spectra were acquired with a scan range 100 to 1000 mass to charge ratio (m/z). The MS parameters were: ESI source in positive ionisation mode, 3000 V capillary voltage, -500 V end plate offset, 310 °C drying gas temperature (N<sub>2</sub>), 8 L.min<sup>-1</sup> flow; 30 psi nebuliser, and MS/MS fragmentation in automatic mode. chromatograms and mass spectra were analysed using DataAnalysis software 4.2. For the analyzes were ignored the compounds initially present in the culture medium.

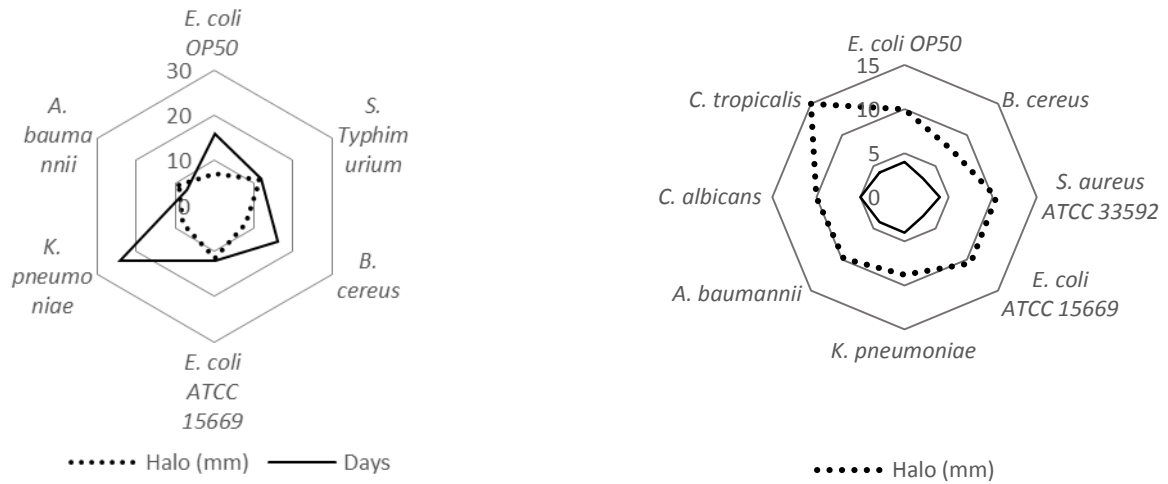
### 2.11 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 6 programs, using analysis of variance (ANOVA), after which the Student's t-test was applied with a p < 0.05.

## RESULTS

Among the strains evaluated by the antagonism test, three strains showed antimicrobial potential, *Trametes elegans* (1699/58c), *Trametes* sp. (1734/29) and *Fomitopsis* sp. (1698/38). All these strains that presented antimicrobial potential belong to the order, Polyporales, saprophyte macrophytes, which were mostly lignolytic.

Isolates of the genus *Trametes* grown as EF demonstrated inhibition of only some of the microorganisms tested. *Trametes* sp. 1734/29 showed antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative microorganisms; however, the largest halos were observed for *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* (ATCC 15669), using extracts produced from broth after 12 days of incubation (Figure 1A). For the other microorganisms evaluated, there was no inhibitory activity. Notably, no extract from the isolate *Trametes* sp. 1734/29 showed activity against *Candida* spp. employed in this test.



**Figure 1.** Size of the inhibition halos in microbial growth (mm) due to the presence of extracts produced from culture broth of *Trametes* sp. 1734/29 in submerged cultures, after different numbers of days of fungal growth. (A) Extracts produced from medium in which mycelia were grown in flasks, with shaking. (B) Extracts produced from medium in which mycelia were grown in a bioreactor.

When extracts were prepared from culture broth of *Trametes* sp. 1734/29 grown in the bioreactor, larger halos of inhibition of microbial growth were obtained than for EF, for a greater range of microorganisms, including yeasts. Notably, EBs produced their effects faster than EFs (Figure 1B).

EB from *Trametes elegans* 1699/58c did not show activity against any of the microorganisms tested. For EFs (Table 1), the highest antimicrobial activity occurred after 12 days of cultivation for most of the microorganisms, with the exception of *S. aureus* ATCC 25923 and *C. albicans* where there was no formation of halo.

**Table 1.** Size of the inhibition halos in microbial growth due to the presence of extract prepared from broth of *Trametes elegans* 1699/58c culture grown in flasks with shaking for 24 days at 28°C. Samples of broth were collected in triplicate at different test times.

Microorganism	Halo* (mm)					
	7 days	12 days	16 days	20 days	24 days	Control**
<b>Gram-negative</b>						
<i>E. coli</i> OP50	7.0±0.0 <sup>a</sup>	9.5±2.1 <sup>b</sup>	9.8±2.0 <sup>b</sup>	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 15669	-	14±0.0 <sup>b</sup>	-	-	-	7.0±0.0 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	8.0±0.0 <sup>a</sup>	9.3±0.8 <sup>a</sup>	8.3±0.9 <sup>a</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	17.5±2.1 <sup>b</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19429	-	8.5±0.7 <sup>a</sup>	-	-	-	8.0±0.0 <sup>a</sup>
<i>A. baumannii</i> ATCC 1906	-	10±0.0 <sup>a</sup>	-	-	-	-
<i>K. pneumonia</i> ATCC BAA 1705	-	12±1.4 <sup>b</sup>	-	-	-	10.5±0.7 <sup>a</sup>
<b>Gram-positive</b>						
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	15.5±7.7 <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	-	14.3±2.5 <sup>b</sup>	9.6±1.9 <sup>a</sup>	8.3±0.8 <sup>a</sup>	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 33592	-	13±0.0 <sup>a</sup>	-	-	-	11.5±2.1 <sup>a</sup>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	9.5±0.7 <sup>a</sup>	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	-	10±0.0 <sup>b</sup>	-	-	-	7.5±0.7 <sup>a</sup>
<b>Yeast</b>						
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	-	-	-	-	-	12.5±0.5 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	-	9.5±0.7 <sup>a</sup>	-	8.5±0.7 <sup>a</sup>	-	9.0±1.0 <sup>a</sup>

(-) resistant (no formation of inhibition halo). Measurements of halos include 5 mm of disk.

\* Measured after 24 h of incubation at 37 °C. Statistical analysis between the bacterium species and the different culture times for the extract production (horizontal line). Values indicated with the same letter did not differ significantly ( $p < 0.05$ ), statistical analysis with ANOVA test and later Student's t-test.

\*\* Amoxicillin (10 µg) was the positive control for bacteria, and fluconazole (32 µg) was used for yeast.

*Fomitopsis* sp. 1698/38 showed antimicrobial activity against all the microorganisms tested, and the most promising results were verified with extracts from cultures grown in the bioreactor (Tables 2 and 3).

**Table 2.** Size of the inhibition halos in microbial growth due to the presence of extract prepared from broth of *Fomitopsis* sp. 1698/38 culture grown in a bioreactor.

Microorganism	Halo* (mm)							Control**
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	
<b>Gram -negative</b>								
<i>E. coli</i> OP50	-	13.3±2.0 <sup>a</sup>	13.3±3.0 <sup>a</sup>	22.33±1.3 <sup>b</sup>	24.3±4.6 <sup>b</sup>	20.0±0.0 <sup>b</sup>	18.6±1.0 <sup>b+</sup>	-
<i>E. coli</i> ATCC 15669	-	15.3±1.3 <sup>b</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	9.3±0.8 <sup>a</sup>	17.5±2.0 <sup>b</sup>	21.0±1.0 <sup>c</sup>	21.0±1.0 <sup>d+</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	-	9.0±1.2 <sup>b</sup>	12.6±0.8 <sup>b</sup>	12.6±0.8 <sup>b</sup>	12.6±0.8 <sup>b</sup>	10.3±2.8 <sup>b</sup>	11.6±4.1 <sup>b+</sup>	17.5±2.1 <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19429	-	11.0±3.2 <sup>b</sup>	13.1±1.3 <sup>b</sup>	15.0±2.6 <sup>b</sup>	13.1±3.8 <sup>b</sup>	14.6±0.8 <sup>b</sup>	10.6±1.2 <sup>b+</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>
<i>A. baumannii</i> ATCC 1906	7.8±1.3 <sup>a</sup>	21.1±1.7 <sup>c</sup>	19.8±1.7 <sup>c</sup>	23.8±1.7 <sup>c</sup>	21.0±1.0 <sup>c</sup>	18.1±0.7 <sup>b</sup>	23.6±1.2 <sup>c+</sup>	-
<i>K. pneumonia</i> ATCC BAA 1705	8.3±0.5 <sup>a</sup>	10.1±0.9 <sup>a</sup>	14.0±1.0 <sup>b</sup>	13.1±0.4 <sup>b</sup>	13.8±0.2 <sup>b</sup>	14.5±1.6 <sup>b</sup>	13.3±0.5 <sup>b+</sup>	10.5±0.7 <sup>a</sup>
<b>Gram-positive</b>								
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	8.5±1.9 <sup>a</sup>	13.8±1.1 <sup>b</sup>	17.3±3.6 <sup>c</sup>	13.6±0.4 <sup>b</sup>	10.0±0.0 <sup>a</sup>	15.6±1.3 <sup>c+</sup>	15.5±7.7 <sup>c</sup>
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	-	11.1±0.7 <sup>a</sup>	15.0±2.4 <sup>b</sup>	14.5±1.5 <sup>b</sup>	9.1±0.2 <sup>a</sup>	14.5±0.8 <sup>b</sup>	13.0±1.5 <sup>b+</sup>	-
<i>S. aureus</i> ATCC 33592	8.0±0.8	7.3±0.5 <sup>a</sup>	10.6±0.8 <sup>b</sup>	9.1±0.9 <sup>a</sup>	21.5±1.0 <sup>c</sup>	20.5±0.5 <sup>c</sup>	7.0±0.8 <sup>a++</sup>	11.5±2.1 <sup>b</sup>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	11.0±0.0 <sup>a</sup>	15.6±1.3 <sup>b</sup>	13.0±1.8 <sup>a</sup>	20.3±0.4 <sup>b</sup>	12.3±1.5 <sup>a</sup>	16.1±2.0 <sup>b+</sup>	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	-	12.0±1.5 <sup>b</sup>	16.0±1.2 <sup>c</sup>	13.3±1.2 <sup>b</sup>	16.0±0.6 <sup>c</sup>	14.8±1.9 <sup>c</sup>	12.0±1.0 <sup>b+</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>
<b>Yeast</b>								
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	-	16.3±1.3 <sup>a</sup>	15.0±0.0 <sup>a</sup>	17.0±1.4 <sup>a</sup>	16.8±0.6 <sup>a</sup>	15.8±0.9 <sup>a</sup>	20.8±2.9 <sup>b+</sup>	12.5±0.5 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	-	8.3±0.5 <sup>a</sup>	18.6±4.2 <sup>b</sup>	18.1±0.7 <sup>b</sup>	23.3±0.5 <sup>c</sup>	22.6±0.5 <sup>c</sup>	18.0±1.2 <sup>b+</sup>	9.0±1.0 <sup>a</sup>

(-) resistant (no formation of inhibition halo). Measurements of halos include 5 mm of disk.

The fungus was grown in a bioreactor for seven days at 28 °C, without pH control. The time of inoculation is zero hour. The other observations are the same as those described in Table 1.

\*\* Amoxicillin (10 µg) was the positive control for bacteria, and fluconazole (32 µg) was used for yeast.

**Table 3.** Size of the inhibition halos in microbial growth due to the presence of extract prepared from broth of *Fomitopsis* sp. 1698/38 grown in flasks with shaking.

Microorganism	Halo* (mm)					Control**
	7 days	12 days	16 days	20 days	24 days	
<b>Gram-negative</b>						
<i>E. coli</i> OP50	-	17.6±2.3 <sup>b</sup>	10.8±1.4 <sup>a</sup>	10.8±2.2 <sup>a</sup>	17.6±0.5 <sup>b</sup>	-
<i>E. coli</i> ATCC 15669	11.0±7.0 <sup>b</sup>	16.0±1.4 <sup>c</sup>	14.0±1.4 <sup>c</sup>	15.5±2.1 <sup>c</sup>	15.5±0.7 <sup>c</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	11.3±2.3 <sup>b</sup>	10.8±2.0 <sup>a</sup>	12.3±1.8 <sup>b</sup>	9.8±1.1 <sup>a</sup>	16.3±3.2 <sup>c</sup>	17.5±2.1 <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19429	13.5±3.5 <sup>b</sup>	11.5±0.7 <sup>b</sup>	12.0±5.6 <sup>b</sup>	18.5±3.5 <sup>c</sup>	14.5±2.1 <sup>b</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>
<i>A. baumannii</i> ATCC 1906	-	17.5±0.7 <sup>a</sup>	13.5±4.9 <sup>a</sup>	15.5±0.7 <sup>a</sup>	15.5±0.7 <sup>a</sup>	-
<i>K. pneumonia</i> ATCC BAA 1705	-	8.5±0.7 <sup>a</sup>	11.0±4.2 <sup>a</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	10.5±0.7 <sup>a</sup>
<b>Gram-positive</b>						
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	16±3.5 <sup>a</sup>	18.5±0.8 <sup>a</sup>	-	14.6±1.3 <sup>a</sup>	15.5±7.7 <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	11.2±2.2 <sup>a</sup>	8.8±0.9 <sup>a</sup>	21.0±1.5 <sup>b</sup>	10.1±1.1 <sup>a</sup>	25.6±2.1 <sup>b</sup>	-
<i>S. aureus</i> ATCC 33592	13.0±0.0 <sup>b</sup>	13.0±2.8 <sup>b</sup>	15.0±1.4 <sup>b</sup>	9.0±1.4 <sup>a</sup>	-	11.5±2.1 <sup>a</sup>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	16.5±0.7 <sup>a</sup>	-	13.5±7.7 <sup>a</sup>	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	13.0±4.5 <sup>b</sup>	16.0±0.0 <sup>b</sup>	15.5±3.5 <sup>b</sup>	16.5±0.7 <sup>b</sup>	15.5±3.5 <sup>b</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>
<b>Yeast</b>						
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	-	-	-	-	-	12.5±0.5 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	10.5±3.5 <sup>a</sup>	21.0±2.8 <sup>c</sup>	15.0±2.8 <sup>b</sup>	19.5±2.1 <sup>c</sup>	15.0±7.0 <sup>b</sup>	9.0±1.0 <sup>a</sup>

(-) resistant (no formation of inhibition halo). Measurements of halos include 5 mm of disk.

The fungus was grown in flasks with shaking for 24 days at 28 °C, without pH control. Samples of broth were collected in triplicate at different test times. The other observations are the same as those described in Table 1.

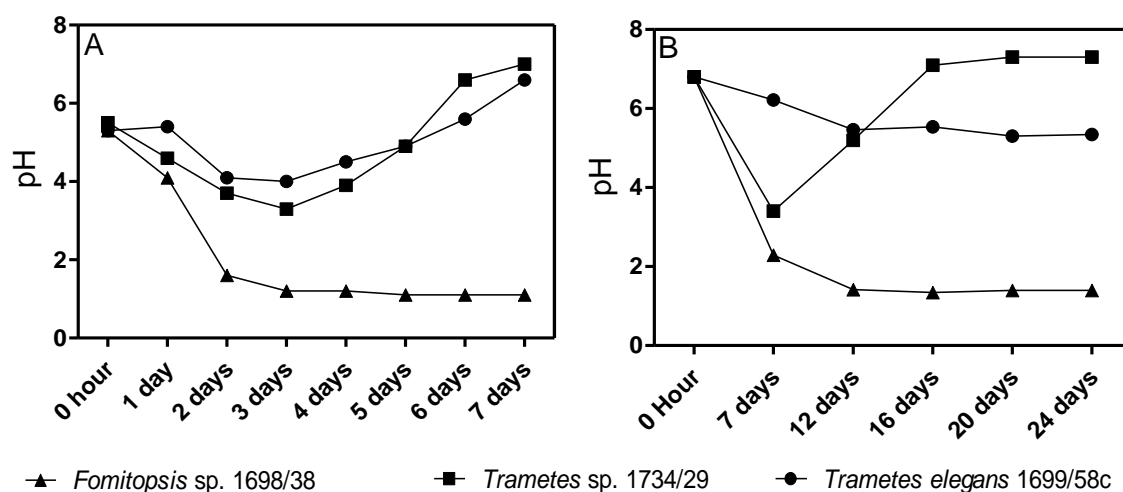
\*\* Amoxicillin (10 µg) was the positive control for bacteria, and fluconazole (32 µg) was used for yeast.

Antibiotics used as a positive control had no antimicrobial effect against *E. coli* OP50, *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) and

*Acinetobacter baumannii* (ATCC 1906), whereas all extracts produced from the second day culture demonstrated efficacy against all evaluated microorganisms. The fact that the bacterial strains were resistant to the drug amoxicillin clearly illustrated the need to obtain new means of microbial control. Notably, EBs had higher levels of antimicrobial substances compared to EFs, indicating bioreactor culture created the best microenvironment for production of such compounds, possibly due to superior aeration.

These data suggested it was possible to optimise the production of antimicrobial substances by this fungus, without negative interference by other products, as happens for many microorganisms. It was recognised that microbial metabolism could lead to the production of organic acids, and consequently a reduction of pH, as observed for the two culturing procedures in this study (Figure 2).

As *Fomitopsis* sp. secondary metabolite production was better in the bioreactor culture, presenting a broader spectrum of action, this procedure was selected for further experimentation, evaluating microbial growth inhibition, cytotoxicity and identification of compounds.



**Figure 2.** pH measurements during submerged cultivation of mycelia of Amazonian macrofungi. (A) cultivation in bioreactor (EB), and (B) cultivation in flask (EF).

**Table 4.** Percentage inhibition of microbial growth by different concentrations of extract from medium of *Fomitopsis* sp. cultures in and a bioreactor.

microorganism	growth inhibition (%)											
	extract concentration (mg.mL <sup>-1</sup> )											
	100		50		25		12.5		6.25		3.1	
	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB
<b>Gram-negative</b>												
<i>Escherichia coli</i> OP50	91	83	90	86	89	86	88	84	87	81	88	83
<i>Salmonella</i>	87	84	79	80	68	74	74	75	68	76	71	68
<i>Typhimurium</i> ATCC 14028												
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15669	80	64	80	59	77	66	75	68	66	66	79	66
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 19429	95	74	85	71	91	61	91	55	90	61	90	53
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA1705	79	57	68	47	61	41	65	35	71	38	8	9
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 1906	78	41	76	36	74	31	63	13	79	46	18	0
<b>Gram-positive</b>												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	84	71	76	71	65	54	60	71	61	71	67	71
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	67	89	69	89	63	84	64	85	65	83	63	87
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	91	89	91	88	89	83	85	87	85	85	86	85
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	84	92	83	91	80	92	70	91	84	89	84	80
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10100	61	36	60	31	56	35	60	35	61	42	61	34
<b>Yeast</b>												
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	90	71	86	50	83	57	84	58	87	67	87	27
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	90	92	90	89	89	89	87	89	90	89	57	71

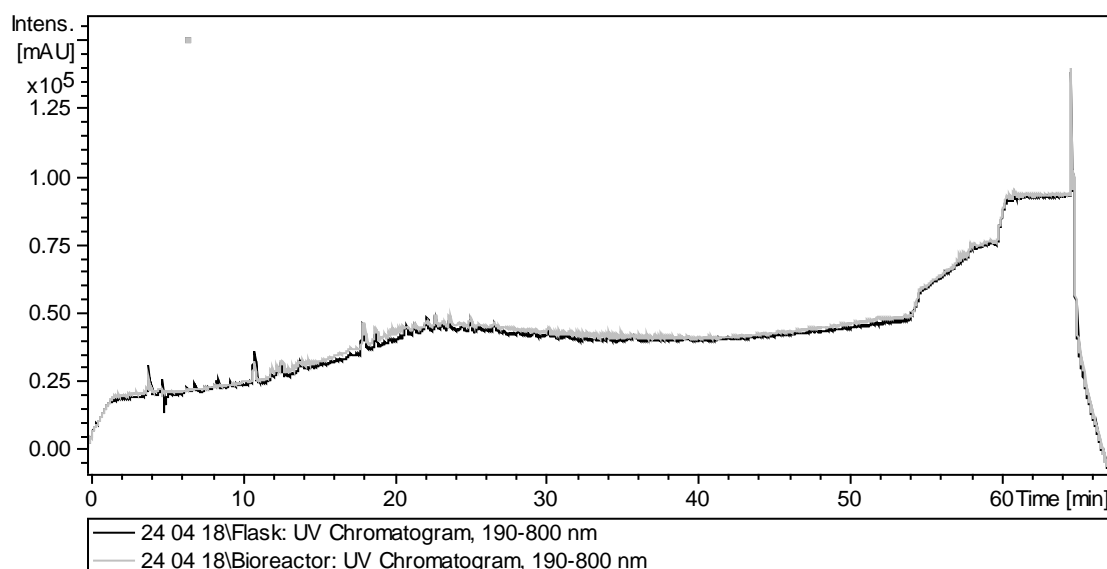
\*The results are expressed as the mean of triplicate samples.

Inhibition of microbial growth was shown to be variable according to the microorganism tested (Table 4). For Gram-negative microorganisms, the majority presented 80-90% inhibition at the maximum concentration tested (100 mg.mL<sup>-1</sup>) for EF. For EB, only *E. coli* (ATCC 15669), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *A. baumannii* presented lower values. For Gram-positive bacteria and yeasts, the inhibition of microbial growth remained between 60 to 80% for the maximum concentration tested. The bactericidal effect, observed by the color change of resazurin, was found from a concentration of 12.5 mg.mL<sup>-1</sup>, for both types of extract and for all tested microorganisms.

The MTT assay did not prove to be useful, because although the extract was filtered, nutrients still present resulted in false positive values (complementary material).

As a result, increasing concentrations of the extract falsely indicated cell viability, when microscopy showed that the cells were not viable, even at the lowest concentrations of extract.

The metabolic profiles of EF and EB were very similar (Figure 3), though indicating differences in compound concentrations, possibly explaining the different results in the inhibition assays. Although an appropriate HPLC-MS technique for phenolic compounds was used, it was not possible to identify phenolic, acidic, flavonoid, tocopherol, carotenoid, coumarin or other metabolites components commonly described in the literature and associated with the basidioma of *Fomitopsis* sp. [17-20]. This indicated that the metabolites present in the basidiomas and secreted in the culture media were different.



**Figure 3.** Metabolic profiles of *Fomitopsis* extracts produced in submerged cultivation in flasks (black line) and in a bioreactor (gray line), generated by high-performance liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-MS/MS).

## DISCUSSION

Inhibition halos formed by extracts from submerged cultures of *Trametes* sp. 1734/29 and *T. elegans* 1699/58c, described in this work, were larger than to those obtained by Lallawmsanga et al. [6], who used five different extracts from submerged cultures of five isolates of *T. elegans*, but did not obtain inhibition of *E. coli* and *Candida albicans*. When tested on *P. aeruginosa*, the maximum inhibition was  $6.26 \pm 0.26$  mm, while for *Staphylococcus aureus* the widest halo was  $6.6 \pm 0.2$  mm. Shen et al. [21] using



extracts from the fruiting body and mycelium of *Trametes* sp., showed antimicrobial activity against *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Salmonella* sp., but not against *K. pneumoniae*. They also described the inhibitory activity of an extract from the basidioma of *Fomitopsis* sp. against *Clostridium perfringens*; however, it showed no activity against *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *Salmonella* sp. This was in contrast to the results in this current study, where extracts of the submerged broth of *Fomitopsis* sp. inhibited all tested microorganisms.

These contrasting results indicate that the habitat in which the fungi were collected, as well as the way it is cultivated, influences the production of secondary metabolites and consequently their antimicrobial activity. Ndyetabura *et al.* [22] reported that mushrooms from different ecosystems and those grown on different substrates produce very different antimicrobials. This was also confirmed in the present work, where the same fungal isolate in the same medium produced extracts with different antimicrobial responses, dependent on the physical treatment of the culture during incubation. It is also possible that different species of *Fomitopsis* were used in the different studies. Even using molecular identification methods allied to classical taxonomy, it was not possible to identify the species.

The broad spectrum of action associated with the extract of *Fomitopsis* sp. might be related to the low pH in the culture during fermentation (Figure 2). Over the time of incubation, the pH dropped to about 1.4 in EF and EB. In EF, this drop happened around the twelfth day, while in EB this fall had occurred by the second day, demonstrating that the metabolism of the fungus was accelerated when grown in a bioreactor. In hostile environments the fungus tends to produce secondary metabolites for its protection [7,21], including acids, which are responsible for the drop in pH seen on cultivation [17,18]. Acids related to the cultivation of *Fomitopsis* sp. include capric, lauric, myristic, pentadecanoic, palmitic, stearic, polyporenic, protocatechuic, vanilic, ascorbic and oxalic [17,18].

The dark staining of the extract made it difficult to read the absorbance, which compromised the inhibition of microbial growth test by the Standart methodology. The results corroborate with that described in the literature [15], that when testing natural products, technique to determine the lowest concentration of extract with bactericidal effect is that of resarzurine, being a direct method of analysis. This allows comparisons between different bacterial strains, with different growth rates, without the influence of the staining of the extract.

Comparisons to previous reports are limited because metabolites vary according to the fungal material used, the solvent used for extraction of metabolites, the collection site and the culture conditions [20]. Dresch *et al.* [23] state that the culture substrate plays an important role in the biosynthesis of secondary metabolites, and even small variations in nutrition may affect the quantity and variety of the metabolites, directly influencing their bactericidal or bacteriostatic effects. For inhibition of *S. aureus*, Gaylan *et al.* [19] obtained an MIC<sub>50</sub> of 2500 mg.mL<sup>-1</sup> from a crude ethanolic extract of *Fomitopsis rosea*, while similar extracts from the fruiting body of *Fomitopsis pinicola* showed MICs of 31–125 µg.mL<sup>-1</sup> for *B. subtilis* and 31–500 µg.mL<sup>-1</sup> for *S. aureus*.

The current study described for the first time antimicrobial properties of a filtrate from submerged culture of *Fomitopsis* sp., with a broad spectrum of action, especially greater inhibition of Gram-negative bacteria. These data demonstrated the potential of extracts of *Fomitopsis* sp. for clinical application, particularly given the difficulty in treating infections caused by Gram-negative bacteria. It was important to perform both the inhibition halo and inhibition of microbial growth tests, since some non-halo-forming microorganisms were inhibited in the inhibition of microbial growth tests. The results of disc diffusion assays could be compromised when using crude extracts with low polarity, with diffusion of the extract being inhibited through the agar [18].

Another advantage presented in the current experiments was the use of culture medium with few synthetic nutrients, which allowed growth of mycelia without the need for acclimatization, or for special nutritional composition for each strain. It is known that synthesis of secondary metabolites can be manipulated by the type and concentration of nutrients in the broth, mainly with regard to sources of carbon and nitrogen. Glucose was used as a source of carbon, being rapidly absorbed, having a low cost and having shown to generate higher yields and greater mycelial growth [24]. Studies show that low concentrations of glucose and nitrogen, lead to increased production of antimicrobial compounds, since such compounds are produced after the exhaustion of these nutrients in the culture medium [24].

When comparing cytotoxicity, there are several studies on the effect of extracts of different species of *Fomitopsis* on tumor cells. Shnyreva *et al.* [25] demonstrated cytotoxicity of 58 µg.mL<sup>-1</sup> aqueous extract of *F. pinicola* mycelia on myelogenous leukemia cells K562. A *F. pinicola* chloroform-based extract was toxic to sarcoma cells (S180) at 120 µg.mL<sup>-1</sup>, and to different leukemia tumor cell lines, HL60, U937 and K562) at 45.13, 39.07 and 139.81 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively [26]. According to Gao *et al.* [26] the

extract damaged the cell membranes, altering the morphology of the cells, as well as triggering *in vitro* condensation of chromatin and causing damage to the DNA, leading to cessation of the cell cycle at S phase and consequently apoptosis. Cellular apoptosis is related to the production of fomitoside K [27], a lanostane triterpene glycoside, identified in methanol extracts of the fruiting bodies of *Fomitopsis nigra* [28].

The methanol extract of *F. pinicola* induced apoptosis in THP-1 (leukemia) and HT29 (adenocarcinoma) cell lines after 24 h of treatment with doses between 5–500  $\mu\text{gml}^{-1}$  [29]. Before current the studies, it was realised that the extracts needed to be tested on normal cells. A possible explanation for the toxicity shown by the extract of *Fomitopsis* sp. 1698/38 was its low pH, because even before incubation phenol red showed an acidic colour change to yellow. This problem in interpretation needs to be overcome in future work by fractionation and purification of substances produced by the Amazonian fungus *Fomitopsis* sp.

Metabolites from the fruiting body of *Fomitopsis* sp have been isolated and identified. The principal metabolites described are phenolic compounds and organic acids [17,18]. Keller et al. [30] described eight steroids isolated from the fruiting body of *F. pinicola*, 3 $\alpha$ -(4-carboxymethyl-3-hydroxy-3-methylbutanoyloxy)-lanosta-8,24-dien-21-oic acid described for the first time, while the other seven were already known: polyporenic acid C, 3 $\alpha$ -acetyloxylanosta-8,24-dien-21-oic acid, ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, 21-hydroxylanosta-8,24-dien-3-one, pinicolic acid A, trametenolic acid B and pachymic acid.

Antimicrobial activity against *B. subtilis* was confirmed for five of the isolated compounds, with only 21-hydroxylanosta-8,24-dien-3-one, pinicolic acid and pachymic acid not being able to inhibit the microorganism. Popova et al. [31] also found that the main compounds of the fruiting body of *F. rosea* are part of the lanostane triterpenes group, with two new compounds being described, 3 $\alpha$ -(3'-butylcarboxyacetoxy)oxepanoquercinic acid C and 3 $\alpha$ -hydroxy-24-methylene-23-oxolanost-8-en-26-carboxylic acid. These two compounds showed antimicrobial activity against *S. aureus*.

None of the above-mentioned compounds were identifiable in *Fomitopsis* sp. Identification of the compounds was hampered by the large amount of secondary metabolites present in the broth, rather than a single major compound. In addition, it was likely that high molecular weight molecules, such as peptides and proteins, were present in these extracts. Another disadvantage was that databases for comparison of MS analyses

had limited information on compounds produced by mushrooms. Therefore, future studies are needed on the metabolomics of exotic mushrooms in order to enhance these databases.

## CONCLUSION

Among the isolates collected from the Amazon biome and evaluated, Polyporales fungi showed the highest potential for the production of metabolites with antimicrobial potential. Extracts from a fungus of the genus *Fomitopsis* stood out due to its broad spectrum of action, including acting more efficiently than commercial antibiotics. Bioreactor cultivation created an environment that promoted the production of metabolites of interest, a fact that contributed to scheduling of this process. This study highlighted an alternative strategy to be explored in the treatment of bacterial infections. In addition, it might contribute in obtaining extracts that could be used in the food industry as alternative food preservatives.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 472153/2013-7 and 310255/2012-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 16/2551-0000246-0), and Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES3255/2013).

## REFERENCES

- [1] de Boer W, Folman L B, Summerbell RC *et al.* Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *Microbiol. Rev.* 2005, 29: 795-811. DOI:10.1016/j.femsre.2004.11.005
- [2] Yaltirak T, Aslim B, Ozturk S *et al.* Antimicrobial and antioxidant actives of *Russula delica* Fr. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47: 2052-2056. DOI:10.1016/j.fct.2009.05.029
- [3] Zerikly M, Challis GL. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem.* 2009, 10: 625-633. DOI:10.1002/cbic.200800389
- [4] Khan A A, Bacha N, Ahmad B *et al.* Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian*

- Pac. J. of Trop. Biomed. 2014, 4: 859-870. DOI: 10.12980/apjtb.4.2014apjtb-2014-0230
- [5] Heleno S A, Barros L, Martins A *et al.* Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. Food Sci. Technol. 2015, 63: 799-806. doi:10.1016/j.lwt.2015.04.028
- [6] Lallawmsanga, Passari A K, Mishra V K *et al.* Antimicrobial Potential, Identification and Phylogenetic Affiliation of Wild Mushrooms from Two Sub-Tropical Semi-Evergreen Indian Forest Ecosystems. Biosynt. Potent. Phyl. Affil. Wild Mush. 2016, 11: 1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166368>
- [7] Carvalho M P, Van Der Sand S I, Rosa E AR *et al.* Investigation of the antibacterial activity of basidiomycetes *Lentinula boryna* and *Lentinula edodes*. Bioc. 2007,15: 173-179.
- [8] Valencia E, Chambergo F S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. Fungal Genet. Biol. 2013, 60: 9-18. DOI:10.1016/j.fgb.2013.07.005
- [9] Souza A Q I, Souza A D L, Astolfi Filho S *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Atrychnos cogens* bentham. Acta Amazonica. 2004, 34: 185-195. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>.
- [10] Munkhgerel L, Erdenechimeg N, Tselmuungarav B *et al.* Chemical composition and biological activities of the *Agaricus* mushrooms. Mongolian J Chem. 2013, 14: 41-45. DOI: <https://doi.org/10.5564/mjc.v14i0.197>
- [11] Gambato G, Todescato K, Pavao E *et al.* Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. Bioresour Technol. 2016, 207: 46-51. DOI:10.1016/j.biortech.2016.01.121
- [12] White T J, Bruns S L, Taylor J W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications 1990. Academic Press, Inc., New York.
- [13] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd informational supplement. M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, Wayne, PA.
- [14] Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat I M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of

- minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol. Lett.* 2016, 38: 1015-1019. DOI 10.1007/s10529-016-2079-2.
- [15] Schuh R, Poletto E, Fachei F N S *et al.* Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide : Implications for CRISPR/Cas technology. *J. Colloid Interface Sci.* 2018, 15: 243-55. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.06.058>
- [16] Rodrigues E, Mariutti L R B, Mercadante A. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61 : 3022-29. DOI:10.1021/jf3054214
- [17] Shah F, Mali T, Lundell T K. Polyporales Brown Rot Species *Fomitopsis pinicola*: Enzyme Activity Profiles, Oxalic Acid Production, and Fe<sup>3+</sup> Reducing Metabolite Secretion. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84: 1-14. DOI:10.1128/AEM.02662-17
- [18] Sulkowska-Ziaja K, Szewczyk A, Galanty A *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of *Fomitopsis betulina*. *Mol Biol Rep.* 2018, 45: 2535-2544. doi: 10.1007/s11033-018-4420-4
- [19] Gaylan C M, Estebal J C, Tantengco O A G, Rragio E L. Anti-Staphylococcal and Antioxidant Properties of Crude Ethanolic Extracts of Macrofungi Collected from the Philippines. *Pharmacogn J.* 2018, 10: 106-109. DOI : 10.5530/pj.2018.1.19
- [20] Grienke U, Zöll M, Peintner U, *et al.* European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. *J Ethnopharmacol.* 2014, 154: 564-583. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.030
- [21] Shen H-S, Shao S, Chen J-C *et al.* Antimicrobials from Mushrooms for Assuring Food Safety. *Com. Rev. Food Sci. Food Safety.* 2017, 16: 316-329. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12255>
- [22] Ndyetabura T, Lyantagaye SL, Mshandete AM.. Antimicrobial activity of ethyl acetate extracts from edible Tanzanian *Coprinus cinereus* (Schaeff) S. Gray slat. cultivated on grasses supplemented with cow dung manure. *J Agric Biol Sci.* 2010, 5:79–8. 5URI: <http://hdl.handle.net/20.500.11810/2104>.
- [23] Dresch P, D’Aguanno M N, Rosam K *et al.* Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. *AMB Express.* 2015, 5: 1- 14. DOI: 10.1186/s13568-014-0093-0

- [24] Sánchez S, Chávez A, Forero A. *et al.* Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot.* 2010, 63: 442-459. DOI: 10.1038/ja.2010.78
- [25] Shnyreva A V, Shnyreva A A, Espinosa C, *et al.* Antiproliferative Activity and Cytotoxicity of Some Medicinal Wood-Destroying Mushrooms from Russia. *Int. J. Med. Mushrooms.* 2018, 20: 1-11. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025250
- [26] Gao Y, Wang P, Wang Y, *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Activity of *Fomitopsis Pinicola* (Sw. Ex Fr.) Karst Chloroform (Fpkc) Extract Against S180 Tumor Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017, 44: 2042-2056. DOI: 10.1159/000485944
- [27] Ravikumar K S, Greeshma P V, George V, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Fomitopsis Dochmius* (Berk. & Broome) ryvarden. *Int J Pharm Sci Res.* 2016, 7: 3666-3674.
- [28] Lee I, Jung J, Yeom J, *et al.* Fomitoside K, a New Lanostane Triterpene Glycoside from the Fruiting Body of *Fomitopsis nigra*. *Micobiol.* 2012, 40: 76-78. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.076>
- [29] Angelini P, Tirillini B, Bistocchi G, *et al* Overview of the Biological Activities of Methanol Extract from Wild Red Belt Conk, *Fomitopsis pinicola* (Agaricomycetes), Fruiting Bodies from Central Italy. *Int J Med Mushrooms.* 2018, 20: 1047-1063. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018028595.
- [30] Keller A C, Maillard M P, Hostettamann K. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phyto.* 1996, 41: 1041- 1046. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00762-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00762-8)
- [31] Popova M, Trusheva B, Gyosheva M, *et al.* Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia*, 2009, 80: 263-266. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.02.008

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

O meio de cultivo utilizado nas fermentações, mostrou-se adequado para a produção de metabólitos secundários, trata-se de um meio de cultivo com poucos nutrientes sintéticos, e que proporcionou o crescimento dos fungos sem a necessidade de aclimação e estudo de composição nutricional especial para cada linhagem. É sabido que a síntese de metabólitos secundários pode ser manipulada pelo tipo e concentração de nutrientes no caldo de cultivo, principalmente pelas fontes de carbono e nitrogênio. Como fonte de carbono, foi utilizado a glicose, trata-se de uma fonte de carbono de rápida absorção, baixo custo, que tem mostrado maiores rendimentos e favoreceu o crescimento do micélio. Estudos mostram que baixas concentrações de glicose e nitrogênio, levam ao aumento da produção de compostos antimicrobianos, uma vez que os compostos são produzidos após o esgotamento destes nutrientes no meio de cultivo (Sánchez *et al.*, 2010).

A forma de cultivo, em frasco ou em biorreator, proporcionaram microambientes diferentes para o desenvolvimento de cada fungo, embora os metabólitos secundários produzidos foram os mesmos, a forma de cultivo influenciou na concentração dos metabólitos produzidos. A variação nas concentrações foi de fundamental importância na avaliação da atividade antimicrobiana contra os microrganismos alvo. Comprovando que o habitat em que os fungos foram coletados, bem como a forma de cultivo influencia na produção dos metabólitos secundários produzidos e conseqüentemente na atividade antimicrobiana. Nesta avaliação, o macrofungo *Fomitopsis* sp. foi o único que formou halo de inibição contra todos os microrganismos testados. Além de que a forma de cultivo em biorreator, para este fungo, mostrou-a a mais adequada para a produção de metabólitos, possibilitando o escalonamento do processo.

A identificação dos compostos presentes nos caldos de cultivo dos fungos, só foi possível depois da purificação dos extratos por extração em fase sólida (SPE), que permitiu retirar os interferentes, purificar e concentrar os analitos presente nas amostras. A identificação e quantificação dos metabólitos secundários de *F. oxysporum* foi realizada com agilidade, uma vez que o caldo de cultivo apresentou menos compostos e também pelo fato de fungos do gênero *Fusarium* serem bastante conhecidos pela produção de micotoxinas. Portanto, há mais dados de sua metabolômica, o que permitiu a caracterização química quase que completa do extrato. Para a identificação dos



metabólitos secundários dos macrofungos houveram dificuldades, tanto pelo alto número de compostos presentes nos extratos, como pela falta de informação sobre sua metabolômica. Embora exista na literatura a descrição de compostos antimicrobianos do extrato do micélio e do corpo de frutificação de cogumelos, não há relatos de compostos presentes no caldo de cultivo. Os macrofungos mais comumente estudados são os comestíveis, ou ainda os poucos estudos se referem a extratos obtidos dos corpos de frutificação, e que procuram grupos de compostos específicos, ignorando outros que possam vir a ter maiores atividades. Portanto, torna-se necessário o aprofundamento do estudo da metabolômica a fim de complementar os bancos de dados para que se explore a diversidade brasileira para a descrição de novos compostos bioativos.

Embora os extratos tenham demonstrado efeitos inibitórios contra os microrganismos testados, na máxima concentração testada ( $100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), eles também demonstraram efeitos tóxicos nas células humanas (HEK -293 e SH-SY5Y). Não se pode afirmar qual dos compostos foi responsável pela citotoxicidade, uma vez que os resultados diferiram para cada tipo de célula e extratos testados. Os resultados podem indicar que o conjunto de metabólitos identificados pode ser responsável pela citotoxicidade. Esta característica implica na purificação do extrato antes de seu uso. Outra possibilidade é que a toxicidade observada foi parcialmente devida ao pH dos extratos. Quando adicionados em concentrações mais elevadas, os extratos até mudaram a cor do meio, evidenciando alterações de pH. Tais resultados, indicam a necessidade de purificação do extrato e correção do pH, para o ajuste de doses antimicrobianas e citotóxicas, possibilitando sua utilização farmacológica.

Os resultados listados nesta pesquisa, permitem descrever pela primeira vez as propriedades antimicrobianas do filtrado de cultivo de *F. oxysporum*, *C. cylindracea* e *Fomitopsis* sp., tendo amplo espectro de ação. Todavia, verificou-se maior destaque para a inibição de bactérias Gram-negativas, demonstrando uma aplicação clínica bastante importante, frente a dificuldade no tratamento de infecções causadas por este tipo de bactéria. À luz da necessidade de desenvolver novos agentes antimicrobianos, os compostos identificados podem ser estudados individualmente para o desenvolvimento de novas drogas ou agentes antimicrobianos, bem como para melhor compreensão da sua citotoxicidade.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem identificar a potencialidade dos fungos *F. oxysporum*, *C. cylindracea* e *Fomitopsis* sp. na produção de metabólitos com potencial antimicrobiano contra as bactérias e as leveduras alvo deste trabalho, ainda que não verificou-se inibição total do desenvolvimento microbiano, o que pode estar relacionado a carga microbiana empregada nos ensaios. Além disso, a análise dos resultados permite concluir que:

- foi possível isolar e identificar através do sequenciamento de DNA das regiões conservadas ITS1 e ITS4, três isolados fúngicos (*F. oxysporum*, *C. cylindracea* e *Fomitopsis* sp.) com potencial antimicrobiano contra as bactérias e leveduras alvo deste trabalho;

- o tempo e a forma de cultivo foram variáveis para cada um dos isolados testados, influenciando diretamente nas concentrações dos metabólitos secundários e conseqüentemente na atividade antimicrobiana;

- o cultivo em frasco teve maior concentração de metabólitos secundários para os cultivos de *F. oxysporum* e *C. cylindracea*;

- o cultivo em biorreator teve maior concentração de metabólitos secundários para o cultivo de *Fomitopsis* sp.;

- o extrato de *Fomitopsis* sp. merece destaque pelo amplo espectro de ação, tendo inibido todos os microrganismos testados;

- os metabólitos secundários presentes no caldo de cultivo de *F. oxysporum* puderam ser identificados como ácido fusárico e seus derivados. Já para *C. cylindracea* e *Fomitopsis* sp. não foi possível a identificação completa dos metabólitos secundários presentes nos caldos de cultivos destes macrofungos devido a escassez de informações nos bancos e também devido ao grande número de metabólitos;

- os três extratos analisados, na máxima concentração (100 mg.mL<sup>-1</sup>) demonstraram atividade antimicrobiana e efeito citotóxico sobre as células HEK-293 e SH-SY5Y.

## 6. PERSPECTIVAS

Como pesquisas para dar continuidade deste trabalho sugere-se:

- identificar, isolar e quantificar os compostos dos extratos brutos, a fim de potencializar sua atividade antimicrobiana;
- testar os compostos isolados quanto a sua atividade antimicrobiana e citotóxica;
- definir condições mais adequadas de cultivo, para a máxima produção de metabólitos e realizar o escalonamento da produção;
- estudar a expressão gênica juntamente com a metabolômica;
- utilizar o extrato e/ou os compostos isolados como aditivos alimentares;
- descrever os compostos químicos dos extratos de *C. cylindracea* e *Fomitopsis* spp., afim de contribuir com os bancos de dados;
- testar os extratos brutos de *F. oxysporum*, *C. cylindracea* e *Fomitopsis* spp. na inibição de formação dos biofilmes;
- testar a estabilidade dos extratos obtidos na atividade antimicrobiana e citotóxica.

## 7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Abreu, J.; A.S.; Rovida, A.F.S.; Pamphile, J.A. (2015) Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, 21: 55-59.
- Adebayo, E.A.; Oloke, J.K.; Ayandele, A.A.; Adeunlola, C.O. (2012) Phytochemical, antioxidant and antimicrobial assay of mushroom metabolite from *Pleurotus pulmonarius* – Lau 09 (JF736658). **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, 2: 366-374.
- Alcantara, M.; Morais, I.C.L.; Mato, C.; Souza, O.C.C. (2012) Principais Microorganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 6: 1- 20.
- Alharbi, S.A.; Wainwright, M.; Alahmadi, T.A.; Salleeh, H.B.; Faden, A.A.; Chinnathambi, A. (2014) What if Fleming had not discovered penicillin? **Saudi Journal of Biological Sciences**, 21: 289-293.
- AL-Kadmy, I.M.S.; Ali, A.N.M.; Salman, I.M.A.; Khazaal, S.S. (2018) Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from Iraqi hospital environment. **New microbe and New infections**, 21: 51-57.
- Almeida, J.C.; Paula, C.M.C.; Svoboda, W.K.; Lopes, M.O.; Pilonetto, M.P.; Abrahão, W.M; Gomes, E.C. (2013) Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, 34: 97-106.
- Alves, M.J.; Ferreira, I.C.F.R.; Dias, J.; Teixeira, V.; Martins, A.; Pintado, M. (2012) A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. **Planta Medica**, 78: 1707-1718.
- Angamuthu, V.; Shanmugavadivu, M.; Nagarajan, G.; Velmurugan, B. (2019) Pharmacological activities of antroquinilol- Mini review. **Chemico-Biological Interactions**, 297: 6-15.
- Antunes, L.C.S.; Visca, P.; Towner, K.J.(2014) *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and disease**, 71: 292-302.
- ANVISA (Consumo e saúde) (2017). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111522/3215539/Boletim>
- Arango, C.S.; Nieto, I.J. (2013) Cultivo biotecnológico de macrohongos comestíveis: uma alternativa en la obtención de nutracéuticos. **Revista Iberoamericana de Micología**, 30: 1-8.

- Aras, A.; Khalid, S.; Jabeen, S.; Farooq, A.A.; Xu, B. (2018) Regulation of cancer cell signaling pathways by mushrooms and their bioactive molecules: Overview of the journey from benchtop to clinical trials. **Food and Chemical Toxicology**, 119: 206-214.
- Arnesen, L.P.; Fagelund, A.; Granum, P.E. (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, 32: 579-606.
- Ashagrie Z.; Woldegiorgis, Dawit Abate, Gulelat D. Haki, Gregory R. Ziegler (2014) Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. **Food Chemistry**, 157: 30-36.
- Bal, C. (2018) Benefits and uses of mushroom. **Journal of Bacteriology & Mycology**, 6: 155-156.
- Bassetti, M.; Peghin, M.; Timsit, J.M. (2016) The current treatment landscape: candidiasis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 71: ii13-ii22.
- Bedia, C.; Cardoso, P.; Dalmau, N.; Garreta-Lara, E.; Canela, C.G.; Gorrochategui, E.; Navarro-Reing, M.; Ortiz-Villanueva, E.; Castelvi, F.P.; Tauler, R. (2018) Applications of Metabolomics Analysis in Environmental Research. **Comprehensive Analytical Chemistry**, 82: 533-582.
- Belda-Galbis, C.M.; Leufvén, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. (2014) Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. **Journal of Food Engineering**, 141: 37-43.
- Béni, Z.; DéKány, M.; Kovács, B.; Csupor-Löffler, B.; Zomborszki, Z.P.; Kerekes, E.; Szekeres, A.; Urbán, E.; Hohmann, J.; Ványolós, A. (2018) Bioactivity-Guided Isolation of Antimicrobial and Antioxidant Metabolites from Mushroom *Tapinella atrotomentosa*. **Molecules**, 23: 1-8.
- Bezerra, W.G.A.; Horn, R.H.; Silva, I.N.G.; Teixeira, R.S.C.; Lopes, E.S.; Albuquerque, Á.H.; Cardoso, W.C. (2017) Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, 66: 301-307.
- Bonta, R.K. (2017) Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolics acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVS). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 7: 349-364.
- BRICs (2018). Disponível em : <http://infobrics.org/>
- Brizuela, M.A.; Garcia, L.; Pérez, L.; Mansur, M. (1998) Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários. **Revista Iberoamericana de Micología**, 15:69-79.

- Bumbamrung, N.; Intaraudom, C.; Dramaee, A.; Boonyen, N.; Veeranodha, S.; Rachtawee, P.; Pittayakhajorwut, P. Antimicrobial activity of illudalane and alliacane sesquiterpenes from the mushroom *Gloestereum incarnatum* BCC41461. **Phytochemistry Letters**, 20: 274-281.
- Calo, J.R.; Crandall, P.G.; O'Bryan, C.A.; Ricke, S.C.(2015) Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. **Food Control**, 54: 111-119.
- Campos, A.C.F.B.; Souza, N.R.; Silva, P.H.; Santana, A.P. (2013) Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 5: 575-580.
- Campos, A.C.; Albieiro, J.; Ecker, A.B.; Kuroda, C.M.; Meirelles, L.E.F.; Polato, A.; Tognim, M.C.B.; Wingeter, M.A.; Teixeira, J.J.V. (2016) Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* cabapenemase-producing *K. pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, 44: 1374-1380.
- Carvalho, M.P.; Van Der Sand, S.I.; Rosa, E.A.R.; Germani, J.C.; Ishikawa, N.K. (2007) Investigation of the antibacterial activity of basidiomycetes *Lentinula boryna* and *Lentinula edodes*. **Biociências**, 15: 173-179.
- Ceci, M.; Delpech, G.; Sparo, M.; Mezzina, V.; Bruni, S.S.; Baldaccini, B. (2015) Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 9: 1195-1203.
- Cevalhos – Cevalhos, J.M.; Reyes-De-Corcuera, J.I.; Etxeberria, E.; Danylik, M.D.; Rodrick, G.E. (2009) Metabolomic analysis in food Science: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 20: 557-566.
- Chaiharn, M.; Phutdhawong, W.S.; Amornlerdpison, D.; Putdhwong, W. (2018) Antibacterial, Antioxidant Properties and Bioactive Compounds of Thai Cultivated Mushroom Extracts against Food-Borne Bacterials Strains. **Chiang Mai Journal of Science**, 45: 1713-1727.
- Chang, S. (2008). Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods, in: Cheung, P.C.K. (Ed.), **Mushrooms as Functional Foods**. John Wiley & Sons, 1–33.
- Chevalier, S.; Boulfatigues, E.; Bodilis, J.; Maillot, O.; Lesouhaitier, O.; Feuilloley, M.G.J.; Orange, N.; Dufour, A.; Cornelis, P. (2017) Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porin. **Microbiology Reviews**, 41: 698-722.
- Chowdhury, M.M.H; Kubra, K.; Ahmed, S.R. (2015) Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms

- cultivated in Bangladesh. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 14: 1- 6.
- de Boer, W.; Folman, L.B.; Summerbell, R.C.; Boddy, L. (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **Microbiology Reviews**, 29: 795-811.
- Espinel-Ingraff, A. (2014) Antifungal Agents. **Reference Module in Biomedical Sciences**.
- Esposito, E; Azevedo, J. L. (2010). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul, RS: EDUCS. 510p.
- FAO. (2018) Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en/>
- Fonseca, M.R.B.; Sato, J.; Lima-Noronha, M.A.; Migliorini, L.B.; Fernandez-Silva, F.S.; Galhardo, R.S. (2018) Increased mutability to fosfomycin in *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Infection, Genetics and Evolution**, 58: 27-33.
- Forghani, F.; Langaee, T.; Eskandari, M.; Seo, K.; Chung, M.; Oh, D. (2015) Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). **Food Control**, 55: 151-157.
- Friedman, N.D.; Temkin, E.; Carmeli, Y.(2016). The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology Infection**, 22: 416-422.
- Funari, C.S.; Castro-Gamboa, I.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.S.(2013) Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, 36:1605-1609.
- Fusco, A.; Coretti, L.; Savio, V.; Buommino, E.; Lembo, F.; Donnarumma, G. (2017) Biofilm Formation and Immunomodulatory Activity of *Proteus mirabilis* Clinically Isolated Strains. **International Journal of Molecular Sciences**, 18:1-11.
- German, J.B.; Hammock, B.D.; Watkins, S.M. (2005) Metabolomics: Building on a Century of Biochemistry to Guide Human Health. **Metabolomics**, 1: 3-9.
- GLASS (Global Antimicrobial Surveillance) (2018) Disponível em: <http://www.who.int/glass/en/>
- Grenni, P.; Ancona, V.; Caracciolo, A.B. (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, 136: 25-39.
- Guimarães, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M.T. (2010) Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of news agents. **Química Nova**, 33: 667-669.

- Gundogan, N. (2014) Klebsiella. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 2: 383-388.
- Gyawali, R.; Albrahim, S. (2014) Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, 46: 412-429.
- Hamilton, A. L.; Kamm, M. A.; Ng, S. C.; Morrison, M. (2018). *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, 31: 1-19.
- Hawksworth, D.L. (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, 95: 641-655.
- Heleno, S.A.; Barros, L.; Martins, A.; Morales, P.; Fernandez-Ruiz, V.; Glamoclija, J.; Sokovic, M.; Ferreira, I.C.F.R. (2015) Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. **Food Science and Technology**, 63: 799-806.
- Hewer, S.C.L.; Smyth, A.R. (2017) Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. **Cochane Database of Systematic Reviews**, 4: 1-3.
- Holmberg, A.; Rasmussen, M. (2016) Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 84: 19-21.
- Hu, B.; Owh, C.; Chee, P.L.; Leow, W.R.; Liu, X.; Wu, Y – L.; Guo, P.; Loh, X.J.; Chen, X. (2018) Supramolecular hydrogels for antimicrobial therapy. **Chemistry society reviews**, 47: 6917-6929.
- Hubschwerlen, C. (2007)  $\beta$ -Lactam Antibiotics. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**, 479-518.
- Hussain, H.; John, M.; Al-Harrasi, A.; Shah, A.; Hassan, Z.; Abbas, G.; Rana, U.A.; Green, I.R.; Schulz, B.; Krohn, K.(2015A) Phytochemical investigation and antimicrobial activity of an endophytic fungus *Phoma* sp.. **Journal of King Saud University – Science**, 27: 92-95.
- Hussain, H.; Drogies, K.H.; Harrasi, A.A.; Hassan, Z.; Shah, A.; Rana, U.A.; Green, R. I.; Draeger, S.; Schulz, B.; Krohn, K. (2015B) Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium* sp..**Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 5: 186-189.
- Hussain, A.; Sohail, M.; Abbas, Z. (2016) Prevalence of *Enterococcus faecalis* mediated UTI and its current antimicrobial susceptibility pattern in Lahore, Pakistan. **Journal of Pakistan Medical Association**, 10: 1232-1236.



- Ibrahim, S.R.M.; Mohamed, G.A.; Al Haidari, R.A.A.; Zayed, M.F.; El-Kholy, A.A.; Elkhayat, E.S.; Ross, S.A. (2018) Fusarithioamide B, a new benzamide derivate from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporum* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. **Bioorganix & Medicinal Chemistry**, 26: 780-790.
- IFT Scientific Status Summary (2004) Bacteria Associated with Foodborne Diseases. **Institute of Food Technologists**, 1-25.
- Isaka, M.; Chinthanom, P.; Suvannakad, R.; Thummarukcharoen, T.; Feng, T.; Liu, J.k. (2019) Fomitopsins I and J, 24 – methyl-lanostane triterpenoids from fruiting bodies of the wood – rot basidiomycete *Fomitopsis* sp. **Phytochemistry Letters**, 29: 176-181.
- Jongenburger, L.; Bassett, J.; Jackson, T.; Zwietering, M.H.; Jewell, K. (2012) Impact of microbial distributions on food safety I. Factors influencing microbial distributions and modeling aspects. **Food Control**, 26: 601-609.
- Joshi, M.; Sagar, A.; Kanwar, S.S.; Singh, S. (2019) Anticancer, antibacterial and antioxidant activities of *Cordyceps militaris*. **Indidam Journal of Experimental Biology**, 57: 15-20.
- Juma, N.A.; Manning, G.; Forsythe, S. (2016) Desiccation survival of *Acinetobacter* spp. in infant formula. **Food Control**, 68: 162-166.
- Karthikeyan, J.S.; Desai, K.M.; Salvi, D.; Bruins, R.; Schaffner, D.W.; Karwe, M.V. (2015) Effect of temperature abuse on frozen army rations: Part 2: Predicting microbial spoilage. **Food Research International**, 76: 587-594.
- Kavanagh, F.; Hervey, A.; Robbins, W.J. (1950) Antibiotic substances from basidiomycetes. VI. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 36: 102-106.
- Kempken, F.; Rohlfs, M. (2010) Fungal secondary metabolite biosynthesis a chemical defense strategy against animals? **Fungal Ecology**, 3: 107-114.
- Khan, A.A.; Bacha, N.; Ahmad, B.; Lutfullah, G.; Farooq, U.; Cox, R.J. (2014). Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 4: 859-870.
- Klaus, A.; Kozarski, M.; Vunduk, J.; Todorovic, N.; Jakovljevic, D.; Zizak, Z.; Pavlovic, V.; Levic, S.; Niksic, M.; Griensven, L.J.L.D. (2015) Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*. **Food Research International**, 67: 272-283.

- Kleinschmidt, S.; Huygens, F.; Faoagali, J.; Rathnayake, I.; Hafner, L.M. (2015) *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. **Future Microbiology**, 10: 1859-1869.
- Kol, S.; Bostanci, A.; Kocabas, A.; Uzun, Y.; Sadi, G. (2018) Cell growth inhibitory potencial of *Craterellu cornucopioides* (L.) Pers. Together with antioxidant and antimicrobial propreties. **Anatolian Journal of Botany**, 2: 60-64.
- Kumar, C.G.; Mongolla, P.; Joseph, J.; Nageswar, Y.V.D.; Kamal, A. (2010) Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, Índia. **Mycologie Médicale**, 20:283-289.
- Kumar, M.; Jaiswal, S.; Sodhi, K. K.; Shree, P.; Singh, D. K.; Agrawal, P. K.; Shukla, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. **Environment International**, 124: 448–46
- Lakhanpal, T.N.; Rana, M. (2005) Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genetic Research**, 3: 288-303.
- Lakhundi, S.; Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, 31: 1-103.
- Lallwmsanga; Passari, A.K.; Mishra, V.K.; Leo, V.V.; Singh, B.P.; Meyyappan, G.V.; Gupta, V.K.; Uthandi, S.; Upadhyay (2016) Antimicrobial Potential, Identification and Phylogenetic Affiliation of Wild Mushrooms from Two Sub-Tropical Semi-Evergreen Indian Forest Ecosystems. **Biosynthetic Potential and Phylogenetic Affiliation of Wild Mushrooms**, 11: 1-24.
- Lentz, S.A.M.; Rivas, P.M.; Cardoso, M.R.I.; Morales, D.L.; Centenaro, F.C.; Martins, A.F. (2018). *Bacillus cereus* as the main casual agent of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years. **Caderno de Saúde Pública**, 34: 1-9.
- Lima , V.N.; Oliveira-Tintino, C.D.M.; Santos, E.S.; Morais, L.P.; Tintino, S.R.; Freitas, T.S.; Geraldo, Y.S.; Pereira, L.S.; Cruz, R.P.; Menezes, I.R.A.; Coutinho, H. D.M. (2016a) Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, 99: 56-61.
- Lima, C.U.J.O.; Gris, E.F.; Karnikowski, M.G.O. (2016b) Antimicrobial propreties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 26: 780-786.

- Lima, M.T.N.S.; Santos, L.B.; Bastos, R.W.; Nicoli, J.R.; Takahashi, J.A. (2018) Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, 49: 169-176.
- Ling, L.I.; Schneider, T.; Peoples A.J.; Spoering, A.L.; Engels, I.; Conlon, B.P.; Muelle, A.; Schäberle, T.F.; Hughes, D.E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V.A.; Cohen, D.R.; Felix, C.R.; Fetterman, K.A.; Milett, W.P.; Nitti, A.G.; Zullo, A.M.; Chen, C.; Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, 517: 455-459.
- Liu, K.; Xiao, X.; Wang, J.; Chen, C-Y O.; Hu, H. (2017) Polyphenolic composition and antioxidant, antiproliferative, and antimicrobial activities of mushroom *Inonotus sanghuang*. **Food Science and Technology**, 82: 154-161.
- Lohmann, J.S.; Wagner, S.; Nussbaum, M.; Pulte, A.; Steglich, W.; Spiteller, P. (2018) Mycenaflavin A, B, C and D: Pyrroloquinoline Alkaloids from the Fruiting Bodies of the Mushroom *Mycena haematopus*. **Chemistry a European Journal**, 24: 8609-8614.
- Luo, C.; Zeng, Z.; Gong, D.; Zhao, C.; Liang, Q.; Zeng, C. (2014) Evaluation of monolaurin from camphor tree seeds for controlling food spoilage fungi. **Food Control**, 46: 488-494.
- Madhanraj, R.; Ravi, K.K.; Maya, M. R.; Ramanath, I.; Venkatakrisna, K.; Rameshkumar, K.; Veeramanikandan, V.; Eyini, M.; Balaj, P. (2019) Evaluation of anti-microbial and anti-haenolytic activity of edible basidiomycetes mushroom fungi. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 9: 132-135.
- Malhadas, C.; Malheiro, R.; Pereira, J.A.; Pinho, P.G.; Baptista, P. (2017) Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 33: 11-12.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (2018). Situação epidemiológica. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos/situacao-epidemiologica>.
- Mattila, P.; Suonpää, K.; Piironen, V. (2000) Functional Properties of Edible Mushrooms. **Nutrition**, 16: 694-696.
- Martinez, R. (2006). An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 32: 449-460.
- Mehdi, Y. Létourneau-Montminy, M.P.; Gaucher, M.L.; Chorfi, Y.; Suresh, G.; Rouissi, T.; Brar, S.K.; Coté, C.; Ramirez, A.A.; Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global and alternatives. **Animal Nutrition**, 4: 170-178.

- Melo, E.S.; Amorim, W.R.; Pinheiro, R.E.E.; Corrêa, P.G.N.; Carvalho, S.M.R.; Santos, A.R.S.S.; Barros, D.S.B.; Oliveira, E.T.A.C.; Medeiros, C.A.; Sousa, F.V.S. (2018) Foodborne diseases and major bacterial agents involved in outbreaks in Brazil: review. **PUBVET**, 10:1-9.
- Meyers, B. R.; Kaplan, K.; Weinstein, L.(1989) Microbiological and pharmacological behavior of 7-Chlorolincomycin. **Applied Microbiology**, 17: 653-657.
- Michelin, L. (2008) Abordagem Biotecnológica em *Proteus mirabilis*. **Tese de doutorado**. Programa de Pós – graduação (Doutorado) em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS.
- Millsop, J.W.; Fazel, N. (2016) Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, 34: 487-494.
- Moretti, M.L.; Trabasso, P.; Lyra L.; Fagnani, R.; Resende M.R.; de Oliveira Cardoso, L.G.; Schreiber, A.z. (2013) Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, 51: 225-230.
- Nascimento, P.F.C.; Nascimento, A.; Rodrigues, C.S.; Antonioli, A.R.; Santos, O.P.; Júnior, A.B.; Trindade, R.C. (2007) Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 17: 108-113.
- Nascimento, T.L.; Oki, Y.; Lima, D.M.M.; Almeida-Cortez, J.S.; Fernandes, G.W.; Souza-Motta, J.S. (2015) Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology**, 14: 79-86.
- Newell, D.G.; Koopmans, M.; Verhoef, L.; Duizer, E.; Aidara-Kane, A.; Sprong, H.; Opsteegh, M.; Langelaar, M.; Threlfall, J.; Scheutz, F.; Giessen, J.; Kruse, H. (2010). Food-borne diseases- The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, 139: 3-15.
- Norsworthy, A.N.; Pearson, M.M. (2017) From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Trends Microbiology**, 25: 304-315.
- O'Connor, P.M.; Ross, R.P.; Hill, C.; Cotter, P.D. (2015) Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Food Science**, 2: 51-57.
- Oliveira, J.J.; Rezende, C.S.M.; Oliveira, A.P.; Moreira, N.M.; Freitas, F.A. (2013) Surtos alimentares de origem bacteriana. **Enciclopédia da Biosfera**, 9: 2416-2433.
- Ooi, V.E.C.; Liu, F. (2000) Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, 7: 715-729.

- OPAS (2001) **Guía veta**: guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias. Buenos Aires.
- Papaguani, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology advances**, 22: 189-259.
- Pereira, A.L.; Pita, J.R.(2005) ALEXANDRE FLEMING (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de letras HISTÓRIA Porto, III série**, 6: 129-151.
- Podschun, R.; Ullmann, U. (1998) *Klebsiella* spp. As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 589-603.
- Pothakos, V.; Devlieghere, F.; Villani, F.; Björkroth, J.; Ercolini, D. (2015) Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**, 109: 66-74.
- Prakash, C.P.; Thirumalai, E.; Rajulu, M.B.G.; Thirunavukkarasu, N.; Suryanarayanan, T.S. (2015) Ecology and diversity of leaf litter fungi during early-stage decomposition in a seasonally dry tropical forest. **Fungal Ecology**, 17: 103-113.
- Putzke, J.; Putzke, M.T.L. (2004) **Os reinos dos fungos**. v.1 e 2, 2 ed. Edinisc, 829p.
- Regiel-Futuyra, A.; Dabrowski, J.M.; Mazuryk, O.; Spiewark, K.; Kyziol, A.; Pucelik, B.; Brindell, M.; Stochel, G. (2017) Review: Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. **Coordination Chemistry Reviews**, 351: 76-117.
- Reis, M.F.; Rocha, C.L.M.S.C. (2015) Medicinal Mushrooms: review on bioactive compounds and biological effects. **Revista de Saúde e Biologia**, 10: 148-164.
- Ren, L.; Hemar, Y.; Perera, C.O.; Lewis, G.; Krissansen, G.W.; Buchanan, P.K. (2014) Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extract of eight edible mushrooms. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, 3: 41-51.
- Roessner, U.; Bowne, J. (2009) What is metabolomics all about? **BioTechniques**, 46: 363-365.
- Rosa, L.H.; Machado, K.M.G.; Jacob, C.C.; Capellari, M.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. (2003) Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 7: 1-8.
- Rosenberger, M.G.; Paulert, R.; Cortez, V.G. (2018) Studies of the Antimicrobial Activity of Mushrooms (Agaricales) from South America (Review). **International Journal of Medical Mushrooms**, 20: 1065-1074.

- Rukchon, C.; Nopwinyuwong, A.; Trevanich, S.; Jinkarn, T.; Suppakul, P. (2014) Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. **Talanta**, 130: 547-554.
- Sadven, P. (2000) Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 17: 73-81.
- Sampaio, P.S.; Sancho, L.G.; Lago, R.F (2018) Implementação da nova regulação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Saúde Coletiva**, 26: 15-22.
- Sánchez, S.; Chavez, A.; Forero, A.; García-HUante, Y.; Romero, A.; Sánchez, M.; Rocha, D.; Avalos, M.; Guzmán-Trampe, S.; Rodriguez-Sanoia, R.; Langlev, E.; Ruiz, B. (2010) Carbon source regulation of antibiotic production. **The Journal Antibiotics**, 63: 442-459.
- Sánchez-Fernández, R.E.; Sánchez-Ortiz, B.L.; Sandoval-Espinosa, Y.K.M.; Ulloa-Benítez, Á.; Armendáriz-Guillén, B.; García-Méndez, M.C.; Macías-Rubalca, M.L. (2013) Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundários bioactivos com utilidade em agricultura y medicina. **Revista especializada em Ciências Químico – Biológicas**, 16: 132-146.
- Santos, G.C.; Vasconcelos, C.C.; Lopes, A.J.O; Cartágenes, M.S.S.; Filho, A.K.D.B.; Nascimento, F.R.F.; Ramos, R.M.; Pires, E.R.R.B.; Andrade, M.S.; Rocha, F.M.G.; Monteiro, C.A. (2018) *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**, 9:1-23.
- Schillaci, D.; Arizza, V.; Gargano, M.L.; Venturella, G. (2013) Antibacterial activity of mediterranean oyster mushrooms species of genus *Pleurotus* (higher basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 6: 591-594.
- Silber, J.; Kramer, A.; Laber, A.; Tadesmir, D. (2016) From Discovery to Production: Biotechnology of Marine Fungi for the Production of New Antibiotics. **Marine Drugs**, 14: 1-20.
- Shafani, M.; Vafai, K. (2010) Syntesis of biofilm resistance characteristics against antibiotics. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, 53: 2943-2950.
- Shen, H.; Shao, S.; Chen, J.C.; Zhou, T. (2017) Antimicrobials from Mushrooms for Assuring Food Safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 16: 316- 329.

- Siu, K.C.; Chen, X.; Wu, J.Y. (2014) Constituents actually responsible for the antioxidant activities of crude polysaccharides isolated from mushrooms. **Journal of Funcional Food**, 11: 548-556.
- Smânia, E.F.A.; Smânia, A.J.; Loguercio-Leite, C. (1998) Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food product. **Revista de Microbiologia**, 4: 317-330.
- Smith, P.A., Koehler, M.F.T., Girgis, H.S., Yan, D., Chen, Y., Chen, Y., Crawford, J.J., Durk, M.R., Higuchi, R.I., Kang, J., Murray, J., Paraselli, P., Park, S., Phung, W., Quinn, J.G., Roberts, T.C., Rougé, L., Schwarz, J.B., Skippington, E., Wai, J., Xu, M., Yu, Z., Zhang, H., Tan, M.-W., Heise, C.E.(2018) Optimized arylomycins are a new class of Gram-negative antibiotics. **Nature**, 561: 189-194.
- Smolskaitė, L.; Venskutonis, P.R.; Talou, T. (2015) Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. **Food Science and Technology**, 60: 462-471.
- Sorendino, G.; Lazzarotto, E.S.; Gonçalves, B.; Krelling, A.; Vasco, J.F.M.; Rodrigues, L.S. (2017) Incidência de *Candida* spp. em hemoculturas de pacientes atendidos em hospital oncológico no sul do Brasil. **Anais de EVINCI**, 3: 16-25.
- Sorensen, J.L.; Sondergaard, T.E. (2014) The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, 170: 55-60.
- Strateva, T.; Atanasova, D.; Savov, E.; Petrova, G.; Mitov, I. (2016). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 20: 127-133.
- Suay, F; Arenal, F.; Asensio, F.J.; Basilio, A.; Cabello, M.A.; Díez, M.T.; García, J.B.; Del VI, A.G.; Gorrochategui, J.; Hernández, P.; Peláez, F.; Vicente, M.F. (2000) Screening of Basidiomicetos for antimicrobial activities. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 78: 129-139.
- Tanday, S. (2016) Resisting the use of antibiotics for viral infections. **The Lancet Respiratory Medicine**, 3: 179.
- Tominaga, T. (2018). Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica* and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays. **Journal of Microbiological Methods**, 147: 43-49.

- Vanderlinde, D.G.; Onofre, S.B. (2010) Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus: Fries) MURRIL. **Revista Saúde e Pesquisa**, 3: 11-16.
- Vieira, F.; Nascimento, T. (2017) Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, 9: 161-168.
- Vuong, C.; Otto, M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, 4: 481-489.
- Xu, X.; Yan, H.; Chen, J.; Zhang, X. (2011) Bioactive proteins from mushrooms. **Biotechnology Advances**, 29: 667–674.
- Xu, Y-J.; Wang, C.; Ho, W.E.; Ong, C.N. (2014) Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. **Trends in Analytical Chemistry**, 56: 37-48.
- Wagner, S.; Sommer, R.; Hinsberger, S.; Lu, C.; Hartmann, R.W.; Empting, M.; Titz, A. (2016) Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, 59: 5929-5969.
- Wang, W.; Chen, R.; Luo, Z.; Wang, W.; Chen, J. (2018) Antimicrobial activity and molecular docking studies of a novel anthraquinona from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **Natural Product Research**, 32: 558-563.
- Warwick, B.D.; Ellis, D.I. (2005) Metabolomics Current Analytical Plataforms and Methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, 24: 285-294.
- Wisbeck, E.; Robert, A.P.; Furlan, S.A. (2002) Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. **Health and Environment Journal**, 3: 7-10.
- Wu, C.; Kim, H.K.; Wezel, G.P.; Choi, Y.H. (2015) Metabolomics in the natural products field- a gateway to novel antibiotics. **Drug Discovery Today: Technologies/Metabolomics in Medicinal Chemistry**, 13: 11-17.
- Wu, Y.; Zhang, T.; Zhang, M.; Zhang, M.; Cheng, J.; Zhang, Y. (2018) An endophytic Fungi of *Ginkgo biloba* L. produces antimicrobial metabolites as potential inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, 128: 265-271.
- Yaltirak, T.; Aslim, B.; Ozturk, S.; Alli, H. (2009) Antimicrobial and antioxidant actives of *Russula delica* Fr. **Food and Chemical Toxicology**, 47: 2052-2056.
- Yang, Y.; Song, W.; Lin, H.; Wang, W.; Du, L.; Xing, W. (2018) Antibiotics an antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. **Environment International**, 116: 60-73.



- Yu, J.; Ye, N.; Gu, X.; Liu, N. (2009) Validation of na HPLC-DAD-ESI/MS/MS method for the classification of Gree Teas. **Computer and Computing Tecnologies in Agriculture II**, 3: 1707-1718.
- Zaidi, S.T.R.; Weier, N.E. (2019). Bacterial Infections and the Role of the Pharmacist. **Encyclopedia of Pharmacy Praticce and Clinical Pharmacy**, 730-741.
- Zhang, L.; Hu, Y.; Duan, X.; Tang, T.; Shen, Y.; Hu, B.; Liu, A.; Cheng, H.; Li, C.; Liu, Y. (2018) Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thirteen boletus mushrooms. **International Journal of Biological Macromolecules**, 113: 1-7.
- Zerikly, M.; Challis, G.L. (2009) Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **Chembiochem**, 10: 625-633.

## **Anexos**

**Pedido de patente - PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO  
ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *FUSARIUM OXYSPORUM*, USO DO  
EXTRATO ANTIMICROBIANO E EXTRATO ANTIMICROBIANO  
PRODUZIDO POR *FUSARIUM OXYSPORUM* OBTIDO PELO PROCESSO**

Número do Processo: BR 10 2019 005151 5

**Campo da Invenção**

[0001] A presente invenção descreve um processo de obtenção de um extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* e o uso do extrato como fonte de ácido fusárico, assim como para preparação de composição farmacêutica antimicrobiana. A presente invenção se situa nos campos da biotecnologia, bioquímica, saúde e medicina.

**Antecedentes da Invenção**

[0002] Os fungos são seres eucariotos heterotróficos classificados entre micro e macro organismos. São capazes de produzir uma série de metabólitos secundários devido à sua capacidade de degradação de uma ampla quantidade de substratos.

[0003] Os metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados no meio de cultivo durante o crescimento do microrganismo e que podem ser isolados e caracterizados para fins industriais. Alguns destes metabólitos secundários são fontes potenciais para produtos farmacêuticos, como antimicrobianos.

[0004] A síntese de metabólitos secundários pode ser manipulada pelo tipo e pela concentração dos nutrientes no meio de cultivo. Os principais nutrientes responsáveis pelo crescimento e metabolismo microbiano são o carbono e o nitrogênio.

[0005] A glicose é, comprovadamente, uma fonte de rápida absorção de carbono pelos microrganismos, sendo ideal para meios de cultivo com a finalidade de produção de metabólitos. A concentração ideal e a fonte, não só de carbono, mas também de nitrogênio, são variáveis para cada microrganismo. Portanto, são necessários estudos específicos de fontes e concentrações de carbono e nitrogênio para cada tipo de microrganismo utilizado para a obtenção de metabólitos específicos.

[0006] Tendo conhecimento que os fungos produzem os antimicrobianos em resposta ao estresse, tal como falta de nutrientes, concentrações baixas dos mesmos favorecem a produção de antimicrobianos, uma vez que estes são produzidos após o esgotamento das fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo.

[0007] Um dos gargalos na extração de substâncias de plantas e fungos é a dificuldade de

se obter substâncias em elevadas concentrações e com relativa pureza, sem a necessidade de processos onerosos.

[0008] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0009] O documento CN 105638669 A descreve a ação do ácido fusárico para controlar Magnaporthe grisea, um fungo patógeno do arroz. Já o documento US 3,935,221 A descreve um método de preparação de amins a partir do ácido fusárico, como sendo um composto para tratar hipertensão.

[0010] O documento US 6,569,864 B1 revela o emprego de ácido fusárico em associação com outras substâncias que podem ser usadas topicamente para tratar uma ampla gama de doenças virais. O documento US 4,772,723 A revela o uso do ácido fusárico como inibidor da enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase.

[0011] Em nenhum dos documentos patentários citados acima, há a descrição ou o objetivo de produção do ácido fusárico. Todos descrevem uma aplicação do ácido ou de seus derivados na forma purificada. Para a obtenção da forma pura, os compostos passam por processos químicos de extração, o que torna o processo demorado e oneroso.

[0012] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

[0013] Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica a partir de um novo processo de obtenção de um extrato antimicrobiano a partir do caldo de cultivo de fungo da espécie *Fusarium oxysporum*, e o uso deste extrato, rico em metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas contra diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas, e contra leveduras do gênero *Candida*. Além de definir o extrato antimicrobiano obtido pelo dito processo, compreendendo ácido fusarinólico, ácido desidrofusárico e 0,06 a 0,8  $\mu\text{g/mL}$  de ácido fusárico.

[0014] A fonte de carbono influencia no crescimento da biomassa e no tipo de metabólito, podendo ter inclusive efeito catabólico sobre o metabolismo secundário. A glicose é uma fonte de carbono de assimilação rápida e de baixo custo. Sua utilização em experimentos tem demonstrado maiores rendimentos no crescimento miceliar. Estudos comprovam que os metabólitos secundários são produzidos ao esgotamento do meio. Portanto, 10 g/L

permitiu um rápido crescimento da biomassa e proporcionou um microambiente ideal para produção de ácido fusárico em apenas 4 dias de cultivo, sendo que a produção de compostos antimicrobianos está relacionada ao estresse fisiológico e a limitação de nutrientes.

[0015] Amalfitano *et al.* (2002) descrevem concentrações de ácido fusárico próximas as descritas nesta invenção, porém o cultivo foi de 4 semanas utilizando um meio de batata – dextrose – ágar. Não é relatos literários de formas de cultivo para *Fusarium oxysporum* que se pareçam com o descrito na presente invenção. A forma de cultivo descrita neste trabalho tem como vantagem o baixo custo e a rapidez do processo, já que não precisa passar por etapas onerosas de purificação e extração dos compostos presentes no meio de cultivo.

[0016] Em um primeiro objeto, a presente invenção descreve o processo de obtenção de extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* compreendendo as etapas de:

- (a) Cultivo de micélio de *Fusarium oxysporum*,
- (b) Separação do micélio;
- (c) Liofilização do caldo fermentativo; e,
- (d) Ressuspensão dos compostos em água em um solvente para obtenção do

extrato de *Fusarium oxysporum*.

[0017] Em um segundo objeto, a presente invenção descreve o uso do extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* obtido conforme definido no primeiro objeto e em suas concretizações por ser como fonte de ácido fusárico e seus derivados.

[0018] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* obtido pelo processo, conforme definido no primeiro objeto e suas concretizações, compreendendo:

- 3,0 a 7,0 µg/mL ácido fusarinólico;
- 1,6 a 4,4 µg/mL ácido desidrofusárico; e,
- 0,06 a 0,8 µg/mL de ácido fusárico.

[0019] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

[0020] São apresentadas as seguintes figuras:

[0021] A figura 1 mostra a porcentagem de inibição do crescimento microbiano de *C. tropicalis* (A), *C. albicans* (B), *S. aureus* ATCC 25923 (C), *S. epidermidis* (D), *S. aureus* ATC 33592 (E), *B. cereus* (F), *E. coli* OP50 (G), *E. coli* ATCC 15669 (H), *P. mirabilis* (I), *S. typhimurium* (J), *K. pneumoniae* (K), *A. baumannii* (L), *E. faecalis* (M) e *P. aeruginosa* (N). Os ensaios de MIC foram executados em triplicata após 24 h de cultivo a 37 °C e leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

A figura 2 mostra a análise de cromatografia líquida do caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum*. Pode-se observar a presença de seis componentes majoritários, com tempos de retenção (1) 12,048 minutos, (2) 12,454 minutos, (3) 15,163 minutos, (4) 20,974 minutos, (5) 24,740 minutos e (6) 25,128 minutos. Os componentes foram identificados em posterior espectrometria de massas.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[0022] A presente invenção descreve o processo de obtenção de extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* e seu uso como fonte de substâncias bioativas, como, ácido fusárico para preparação de composição farmacêutica antimicrobiana.

[0023] Em um primeiro objeto, a presente invenção descreve o processo de obtenção de extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* compreendendo as etapas de:

- (a) Cultivo de micélio de *Fusarium oxysporum*,
- (b) Separação do micélio;
- (c) Liofilização do caldo fermentativo; e,
- (d) Ressuspensão dos compostos em água em um solvente para obtenção do

extrato de *Fusarium oxysporum*.

[0024] Em uma concretização do processo, a etapa (a) é realizada em caldo de cultivo submerso líquido em que o dito caldo compreende 0,1 a 5% de glicose, 0,1 a 1 % de peptona e 0,1 a 5 % de extrato de carne.

[0025] Em uma concretização do processo, o dito caldo de cultivo compreende opcionalmente sacarose, amido, frutose, hidrolisados proteicos animais, vegetais ou fúngicos em concentração entre 0,1 a 5 %.

[0026] Em uma concretização do processo, a etapa (a) ocorre em um frasco Erlenmeyer ou em um biorreator.

[0027] Em uma concretização do processo, a etapa (a) compreende as seguintes etapas:

- a1) Inocular três discos de cultivo com 1,5 cm da cultura de *F. oxysporum*.
- a2) Manter o cultivo por quatro dias em frasco de Erlenmeyer ou em biorreator.
- a3) Caso o cultivo seja em biorreator, utilizar 300 mL de pré-cultivo de 24h.

[0028] Em uma concretização do processo, etapa de separação do micélio (b) ocorre por centrifugação a 4000 rpm, 4°C por 20 min, após 4 dias de cultivo.

[0029] Em uma concretização do processo, a etapa (d) ocorre em um solvente selecionado entre água destilada estéril, metanol, etanol, propanol, butanol, acetonitrila ou outros solventes de baixa polaridade.

[0030] Em um segundo objeto, a presente invenção descreve o uso do extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* obtido pelo processo, conforme definido no primeiro objeto e em suas concretizações por ser como fonte de ácido fusárico e seus derivados.

[0031] Em uma concretização do uso, os ditos derivados são Ácido Fusarinólico, Isômero ácido Fusarinólico, Ácido Desidrofusárico ou uma misturas destes.

[0032] Em uma concretização do uso, o extrato é para a preparação de uma composição farmacêutica antimicrobiana.

[0033] Em uma concretização do uso, o extrato é para preparação de uma composição farmacêutica para tratar doenças causadas por bactérias Gram – positivas, Gram – negativas e leveduras.

[0034] Em uma concretização do uso, as ditas bactérias Gram-positivas são *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e *Staphylococcus epidermidis*, as ditas bactérias Gram-negativas são *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* e as ditas leveduras são *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

[0035] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* obtido pelo processo, conforme definido no primeiro objeto e suas concretizações, compreendendo:

- 3,0 a 7,0 µg/mL ácido fusarinólico;
- 1,6 a 4,4 µg/mL ácido desidrofusárico; e,
- 0,06 a 0,8 µg/mL de ácido fusárico.

Preferencialmente, o método de cultivo é por fermentação em frasco, mas não limitada ao mesmo, podendo incluir outros processos, como fermentação em biorreator.

[0036] O extrato obtido pelo processo descrito pela presente invenção é utilizado para o controle de crescimento das bactérias Gram – positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

[0037] As bactérias Gram – negativas contempladas pela presente invenção são

*Escherichia coli* OP50, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 15669, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19429, *Enterococcus faecalis* ATCC 10100, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 e *Acinetobacter baumannii* (CT) ATCC 1906. As leveduras cujo crescimento foi controlado pelo extrato obtido pelo método da presente invenção são: *Candida albicans* ATCC 24433 e *Candida tropicales* ATCC 28707.

[0038] A maioria dos trabalhos relatam a atividade antimicrobiana de extratos oriundos do micélio ou de esporos de *Fusarium oxysporum*, sendo o caldo de cultivo desprezado. Para a produção deste tipo de extrato, o fungo é crescido por tempo superior a 10 dias em meios complexos, com presença de sais como: ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Durante a extração dos componentes ativos são utilizados solventes como metanol, acetato de etila ou hexano, que precisam ser evaporados ao final do processo, o que aumenta o custo e o tempo de obtenção do extrato. A presença de solventes como metanol, acetato de etila ou hexano podem ser um problema na produção de fármacos e/ou conservantes de alimentos, devido a sua toxicidade.

[0039] Na presente invenção, o extrato é obtido em 4 dias de cultivo, sendo que os compostos ativos encontram-se no caldo de cultivo, o que torna possível a utilização do fermentado como um todo (micélio e caldo). Além de não precisar passar por processos de extração ou evaporação de solventes, diminuindo tempo e custos.

[0040] O método de cultivo e o processo de obtenção do extrato de *Fusarium oxysporum* segundo a presente invenção é uma alternativa para meios já conhecidos, uma vez que permite a obtenção de uma quantidade maior de ácido fusárico e seus derivados, tornando a produção mais econômica e permitindo o aproveitamento do micélio do fungo.

[0041] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

#### Exemplo 1 – Produção do caldo de cultivo com propriedades antimicrobianas

[0042] Foram cultivados em meio submerso líquido em frasco Erlenmeyer micélios de *Fusarium oxysporum*. O meio submerso compreendia 1 % de glicose, 0,5 % de peptona e 0,3 % de extrato de carne como fontes de carbono e nitrogênio.

#### Exemplo 2 – Processo de obtenção de extratos produzido por *Fusarium oxysporum*

[0043] O processo de obtenção do extrato a partir do filtrado do material obtido após o método de cultivo da presente invenção compreende uma etapa de cultivo de 4 dias. O cultivo do fungo para a obtenção do caldo de cultivo envolve as etapas de:

(a) Inoculação de três discos de cultivo com 1,5 cm da cultura de *Fusarium oxysporum*;



(b) Manter o cultivo por quatro dias em frasco ou em biorreator e, caso em biorreator, deve-se utilizar 300 mL de pré-cultivo de 24 h;

(c) Centrifugar o cultivo a 4000 rpm, 4 °C por 20 minutos, para a separação do micélio.

[0044] Após a centrifugação, o material é liofilizado e ressuspenso em água destilada estéril na concentração de 100 mg/mL.

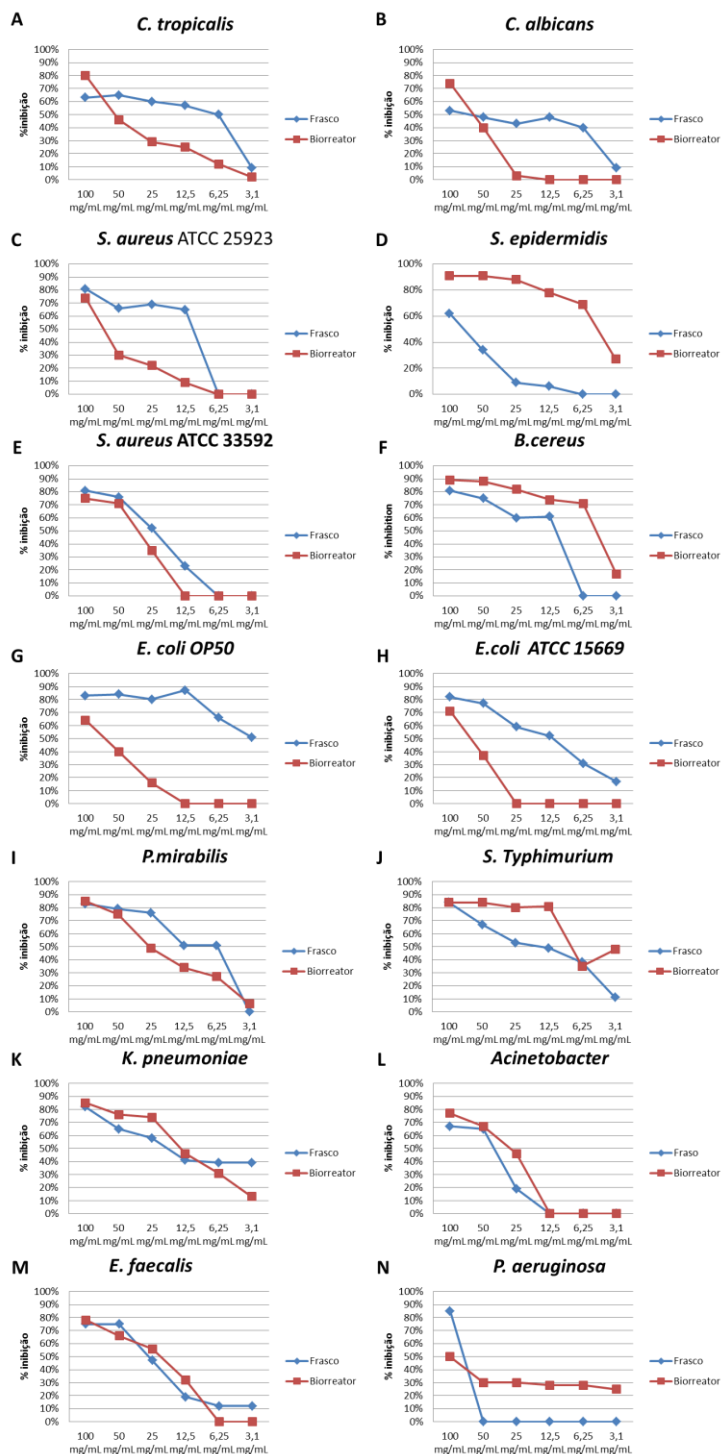
[0045] Preferencialmente, o solvente utilizado deve ser água, mas não limitado a esta, desta forma evitando transtornos pela ingestão de solventes tóxicos. Outros solventes que podem ser utilizados são o metanol ou outros de menor polaridade.

### Exemplo 3 – Ensaios de inibição de crescimento contra as bactérias e leveduras

#### alvo

[0046] A avaliação da atividade antimicrobiana deu-se pelo teste de difusão em disco. Para tanto, volumes de 15 µL (100mg/L) do extrato foram distribuídos sobre disco de papel filtro esterilizados de diâmetro 0,5 cm e densidade 250 g/m<sup>2</sup>. O controle negativo foi feito utilizando 15 µL de água estéril, solvente utilizado para diluir o extrato. Estes discos foram secos sob o fluxo da cabine biológica, e utilizados para a realização do teste de sensibilidade antimicrobiana.

[0047] Para tanto, as culturas dos microrganismos foram crescidas em caldo nutriente, durante 18 h, tendo sua concentração padronizada em 10<sup>8</sup> células/mL. Com o auxílio de um *swab* estéril, cada cultura foi distribuída sobre o meio de cultivo ágar nutriente. Sobre os microrganismos inoculados foram distribuídos os discos contendo o extrato de *Fusarium oxysporum*. As placas foram mantidas a 37°C durante 24 h. A inibição do crescimento microbiano foi avaliada pela medida do halo de inibição (mm) do crescimento. Os gráficos referentes a inibição do crescimento estão apresentados na Figura 1.



[0048] A Tabela 1 descreve os resultados obtidos quanto ao diâmetro do halo de inibição produzido pelo extrato em diferentes dias de cultivo, tanto em frasco (EF) como em biorreator (EB).

[0049] Para as bactérias Gram-negativas, verificou-se que os extratos de *Fusarium oxysporum* apresentaram inibição do crescimento microbiano de todos os microrganismos testados em pelo menos um tipo de produção (EB ou EF) e em todos os

tempos avaliados (com exceção de *E. coli* ATCC 15669 que não apresentou halo no segundo dia em EB e EF). Verificou-se ação antimicrobiana diferencial para as duas linhagens de *E. coli* avaliadas, fato que também se repetiu para o antibiótico comercial utilizado como controle. Ressalta-se que todos os extratos produzidos por *Fusarium oxysporum* apresentaram halos de inibição do desenvolvimento microbiano para *E. coli* OP50, enquanto o antibiótico amoxicilina não demonstrou o mesmo efeito. O antibiótico comercial também não teve efeito inibitório contra *A. baumannii*, enquanto que o extrato EF obteve um halo de inibição de 12,5 mm, aos dois dias de cultivo.

**[0050]** Para as bactérias Gram-positivas avaliadas, verificou-se que os extratos provenientes dos cultivos em biorreator não apresentaram potencial para inibir a formação de halos de crescimento microbiano em nenhum momento para as linhagens *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, enquanto que nos extratos provenientes de cultivo em frascos houve formação de halo. Cabe também destacar que a amoxicilina não apresentou halo de inibição do crescimento microbiano para *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228. O maior halo de inibição para microrganismos Gram – positivos, deu-se sobre *E. faecalis*, com extrato EF aos dois dias de cultivo. Para os isolados de *B. cereus* e *S. epidermidis* o extrato teve melhores resultados que o controle positivo. Enquanto a amoxicilina não formou halo de inibição, no tratamento com o extrato, os halos máximos chegaram a 18 e 16 mm, respectivamente. A média do diâmetro dos halos de inibição para microrganismos Gram – positivos foi maior se comparado aos Gram – negativos, indicando uma possível ação do extrato na parede celular de peptidoglicano.

**[0051]** Para as duas leveduras avaliadas também foi identificado o potencial dos extratos fúngicos provenientes de frascos para inibir o desenvolvimento destes microrganismos. Sendo que para *C. tropicalis* a inibição foi maior que *C. albicans*. Os resultados de inibição dos extratos de frasco, ainda são compatíveis aos do controle com fluconazol.

**[0052]** Comparando-se os dados de inibição do crescimento microbiano, verificou-se que os cultivos em frascos possibilitaram maiores inibições em tempos menores que os extratos produzidos em biorreator, demonstrando que condições adversas podem contribuir para a produção de metabólitos antimicrobianos por *F. oxysporum*. Verifica-se claramente que existe variação da atividade antimicrobiana dos extratos nos diferentes tempos em que foram produzidos, indicando que existe variação nos metabólitos e concentrações produzidas.

**[0053]** **Tabela 1.** Diâmetro do halo de inibição (mm), incluindo 5 mm do disco do extrato

de metabólito secundário em diferentes dias de cultivo do fungo *F. oxysporum*, produzido em frasco (EF) e em biorreator (EB), sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras do gênero *Candida*.

Microrganismo	Diâmetro do halo de inibição (mm)						
	2 dias		3 dias		4 dias		Controle Positivo **
	EF	EB	EF	EB	EF	EB	
<i>Gram-negativo</i>							
<i>E. coli</i> OP50	10.6±0.4 <sup>a</sup>	9.8±1.1 <sup>a</sup>	10.0±0.0 <sup>a</sup>	9.8±1.1 <sup>a</sup>	11.0±1.0	13.3±1.3 <sup>a</sup>	não <sup>d</sup>
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	8.1±2.4 <sup>a</sup>	9.0±1.0 <sup>a</sup>	9.0±1.4 <sup>a</sup>	8.8±2.0 <sup>a</sup>	11.8±1.6 <sup>a</sup>	8.8±2.0 <sup>b</sup>	17.5±2.1 <sup>c</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 15669	não <sup>a</sup>	não <sup>a</sup>	não <sup>a</sup>	7.0±1.4 <sup>b</sup>	11.0±1.4 <sup>a</sup>	8.0±1.4 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>b</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19429	6.5±0.7 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	12.0±4.2 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	11.5±2.1 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	10.0±1.4 <sup>a</sup>	7.5±0.7 <sup>a</sup>	10.5±0.7 <sup>a</sup>
<i>A. baumannii</i> ATCC 1906	12.5±4.9 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	10.0±1.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	não <sup>b</sup>
<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	8.0±1.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	10.0±0.0 <sup>a</sup>	8.0±1.4 <sup>b</sup>	7.0±0.0 <sup>a</sup>	9.5±0.7 <sup>a</sup>	24.0±0.0 <sup>c</sup>
<i>Gram-positivo</i>							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10.5±2.2 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	10.1±1.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	13.8±2.1 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	15.5±7.7 <sup>b</sup>
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	14.8±2.9 <sup>a</sup>	7.0±1.0 <sup>b</sup>	13.3±2.8 <sup>a</sup>	8±0.6 <sup>b</sup>	17.1±0.8 <sup>a</sup>	14.3±2.8 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 33592	10.0±0.0 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	15.0±2.8 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	12.0±1.4 <sup>a</sup>	9.0±0.0 <sup>a</sup>	11.5±2.1 <sup>a</sup>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	11.0±1.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	14.0±8.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	9.5±0.7 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	não <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	19.0±0.0 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	17.0±2.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	9.0±4.2 <sup>a</sup>	7.0±0.0 <sup>b</sup>	7.5±0.7 <sup>b</sup>
<i>Levedura</i>							
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	11.5±4.9 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	6.5±0.7 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	7.5±2.1 <sup>a</sup>	11.0±1.4 <sup>a</sup>	12.5±0.5 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	18.5±4.9 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	8.0±1.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	8.0±1.4 <sup>a</sup>	não <sup>b</sup>	9.0±1.0 <sup>a</sup>

\*nã: não houve formação do halo de inibição

\* Medida após 24h de incubação a 37°C. Medidas de duplicatas e estimativa de desvio padrão.

\*\* O controle positivo para bactérias foi realizado com discos comercial de amoxicilina (10mcg) e para leveduras fluconazol (32mcg).

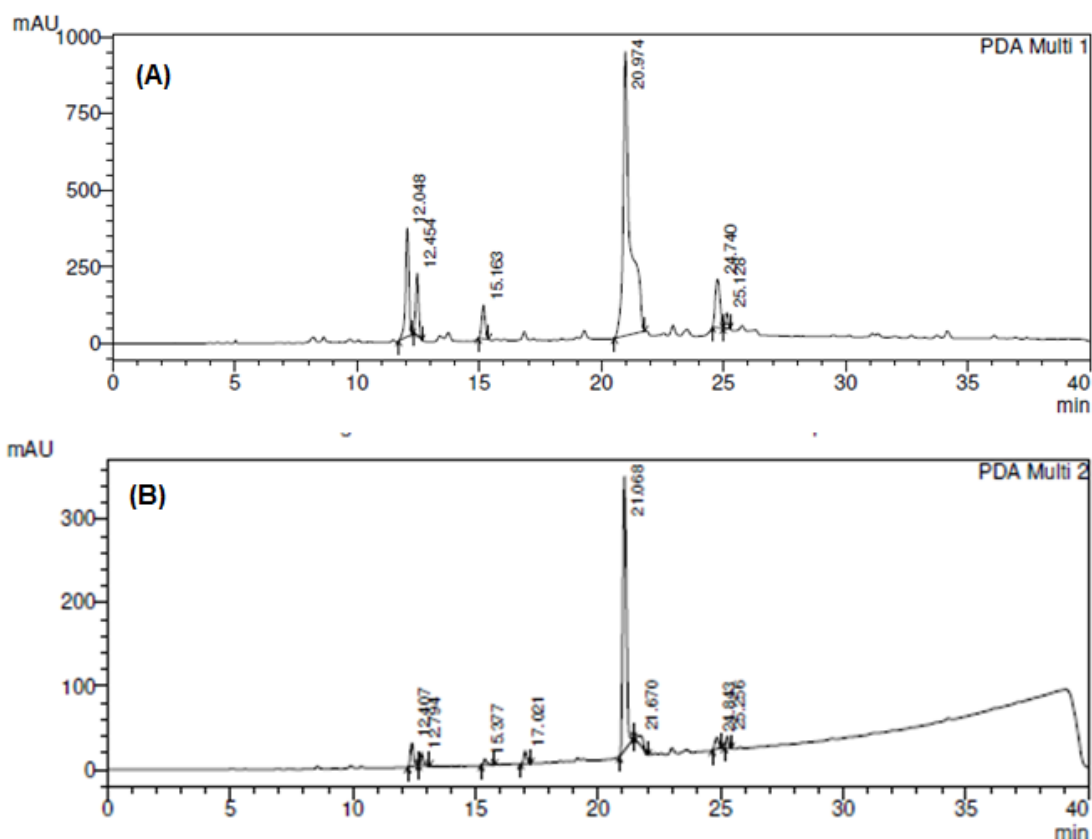
Análise estatística entre a bactéria e os diferentes tempos de cultivo para a produção do extrato (linha horizontal). Valores assinalados com a mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), análise estatística com teste ANOVA e posterior *Student's T-test*.

#### Exemplo 4 – Análise do extrato obtido por espectrometria de massas

A extração dos compostos fenólicos presentes nos extratos foi realizada utilizando o Kit para extração em fase sólida *Strata* (Phenomenex®). Ao final da extração, as amostras foram rota-evaporadas (38 °C) para a total evaporação dos solventes, metanol e água. Após, os extratos foram analisados por HPLC-DAD-ESI-MS para identificação das massas das substâncias. Os extratos foram dissolvidos em metanol filtrado em membrana

PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ . Os compostos foram separados em uma coluna  $\text{C}_{18}$  *Supelco Analytical* (5 $\mu\text{m}$ , 15 cm  $\times$  4.6 mm), utilizando como fase móvel um gradiente linear, sendo a fase móvel A composta por água e 0,5 % ácido fórmico; enquanto a fase móvel B, composta por acetonitrila e 0,5 % de ácido fórmico. O fluxo da fase móvel foi de 0,7 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 29 °C. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados a 280 e 429 nm. Após a saída do detector DAD, um divisor de fluxo permitiu a entrada de 0,45 mL/min no MS. Os espectros de massas foram obtidos com um *scan range* de  $m/z$  100 a 800. Os parâmetros do MS foram os seguintes: fonte ESI no modo de ionização positivo e negativo; voltagem do capilar: 3000 V, temperatura do gás de secagem ( $\text{N}_2$ ): 310 °C, fluxo: 8 L/min, nebulizador: 30 psi; fragmentação no modo automático e energia de fragmentação  $\text{MS}^2$ : 35 eV. A quantificação dos compostos foi realizada em HPLC. A curva de regressão linear foi calculada pela injeção de diferentes concentrações de uma solução padrão de ácido fusárico (Sigma®) em concentrações entre 0,024 e 6,25 mg / mL, diluídas em água ultra pura, com detecção a 271 nm. As amostras de EF e EB foram diluídas em bandas consistentes com a curva de calibração linear e não passaram na purificação da SPE. As análises foram realizadas em triplicatas. Os derivados do ácido fusárico foram calculados como equivalentes do ácido fusárico.

**[0054]** Na Figura 2 está apresentado os cromatogramas do extrato de quatro dias de cultivo, sendo o mesmo perfil de componentes majoritários em EF (A) e EB (B). Verificou-se a presença de 6 picos que apresentaram maiores áreas. Após análise dos tempos de retenção e espectrômetro gerado pelo MS  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  comparados com a descrição literária, pode-se identificar os compostos majoritários dos extratos. Destacando-se a presença de ácido fusarinolico ( $m/z$  196,1033) e um isômero seu ( $m/z$  196,1027), ácido desidrofusárico ( $m/z$  178,0901) e ácido fusárico ( $m/z$  180,1063) (Tabela 2).



[0055] Pelas análises, utilizando a forma de cultivo descrita na presente invenção, ao final de quatro dias de fermentação, foi obtido aproximadamente: 7  $\mu\text{g/mL}$  ácido fusarinólico, 4.4  $\mu\text{g/mL}$  ácido desidrofusárico e 0.8  $\mu\text{g/mL}$  de ácido fusárico. Quantidade muito maior do que as descritas na literatura por outros métodos. Como por exemplo, no artigo científico “HPLC Analysis of Fusaric Acid, 9,10-Dehydrofusaric Acid and their Methyl Esters, Toxic Metabolites from Weed Pathogenic *Fusarium* Species de Amalfitano *et al.* (2002) no qual foram utilizadas duas linhagens de *F. oxysporum*, em uma fermentação estática de quatro semanas, utilizando meio com batata e dextrose obtiveram 0.4 e 0.6  $\mu\text{g/mL}$  de ácido fusárico, além de 0.3 e 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de ácido dehidrofusárico. Um outro exemplo, é o artigo científico “Estimation of fusaric acid from culture filtrate of *Fusarium udum* by thin layer chromatography” de Shinde & Deshmuki (2014) no qual foram obtidas uma produção de 606.66  $\mu\text{g/L}$  de ácido fusárico em 20 dias de cultivo utilizando meio Czapeck-Dox, ideal para crescimento do *Fusarium* e produção de seus metabólitos.

[0056] O extrato EF possui a maior quantidade dos ácidos identificados, sendo a quantidade de ácido fusárico é mais de 10 vezes maior que a concentração em EB. Esse resultado explica a maior inibição microbiana pelos extratos EF.

**Tabela 2.** Características cromatográficas espectroscópicas dos compostos encontrados obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS

Composto <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> <sup>b</sup> (min)	λ máx (nm)	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> (+)	Concentração (µg/mL)	
					EF	EB
Ácido Fusarinolico	12,2	271	196,1033	168,1072		
Isômero ácido Fusarinolico	12,6	271	196,1027	-	7*	3*
Não Identificado	15,2	271	314,2037	247,1116	0.1	0.4
Ácido Desidrofusarico	21,1	271	178,0915	150,0959	4.4	1.6
Ácido Fusárico	24,9	271	180,1065	152,1109	0.8	0.06
Não identificado**	25,1	444	377,1525	243,0936		

\*A concentração de ácido fusarinolico e seu isômero foram calculadas juntamente, pois não foi possível separar os picos adequadamente/ \*\* Não foi possível calcular a concentração.

<sup>a</sup> Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na Figura 2. <sup>b</sup> Tempo de retenção de uma coluna C18.

[0057] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

### Reivindicações

1. Processo de obtenção de extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* **caracterizado** por compreender as etapas de:

(a) Cultivo de micélio de *Fusarium oxysporum*;

(b) Separação do micélio;

(c) Liofilização do caldo fermentativo; e,

(d) Ressuspensão dos compostos em um solvente para obtenção do extrato de *Fusarium oxysporum*

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela etapa (a) ser realizada em caldo de cultivo submerso líquido em que o dito caldo compreende 0,1 a 5% de glicose, 0,1 a 1 % de peptona e 0,1 a 5 % de extrato de carne.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo dito caldo de cultivo compreender opcionalmente sacarose, amido, frutose, hidrolisados proteicos

animais, vegetais ou fúngicos em concentração entre 0,1 a 5 %.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela etapa (a) ocorrer em um frasco Erlenmeyer ou em um biorreator.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pela etapa (a) compreende as seguintes etapas:

a1) Inocular três discos de cultivo com 1,5cm da cultura de *F. oxysporum*.

a2) Manter o cultivo por quatro dias em frasco de Erlenmeyer ou em biorreator.

a3) Caso o cultivo seja em biorreator, utilizar 300 mL de pré-cultivo de 24h.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela etapa de separação do micélio (b) ocorrer por centrifugação a 4000 rpm, 4°C por 20min, após 4 dias de cultivo.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela etapa (d) ocorrer em um solvente selecionado entre água destilada estéril, metanol, etanol, propanol, butanol, acetonitrila ou outros solventes de baixa polaridade.

8. Uso do extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* obtido pelo processo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por ser como fonte de ácido fusárico e seus derivados.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelos ditos derivados serem Ácido Fusarinolico, Isômero ácido Fusarinolico, Ácido Desidrofusarico ou uma misturas destes.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** por ser para preparação de uma composição farmacêutica antimicrobiana.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** por ser para preparação de uma composição farmacêutica para tratar doenças causadas por bactérias Gram – positivas, Gram – negativas e leveduras.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelas ditas bactérias Gram-positivas serem *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e *Staphylococcus epidermidis*, pelas ditas bactérias Gram-negativas serem *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* e pelas ditas leveduras serem *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

13. Extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* obtido pelo processo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por compreender:



- 3,0 a 7,0 µg/mL ácido fusarinólico;
- 1,6 a 4,4 µg/mL ácido desidrofusárico; e,
- 0,06 a 0,8 µg/mL de ácido fusárico.

### **Resumo**

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *FUSARIUM OXYSPORUM*, USO DO EXTRATO ANTIMICROBIANO E EXTRATO ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *FUSARIUM OXYSPORUM* OBTIDO PELO PROCESSO.

A presente invenção descreve o processo de obtenção de um extrato antimicrobiano produzido por *Fusarium oxysporum* a partir de um cultivo submerso de micélio e seu uso como fonte de ácido fusárico para utilização na preparação de composições farmacêuticas antimicrobianas e, mais especificamente, para preparação de um medicamento para tratar doenças causadas por bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras do gênero *Candida*. Mais especificamente, a presente invenção descreve o extrato antimicrobiano obtido pelo processo conforme definido no primeiro objeto da invenção. A presente invenção se situa nos campos da biotecnologia, bioquímica, saúde e medicina.