

FELIPE ANDRES MONSALVE MARIN

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESTATINAS E
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR FUNGOS
ISOLADOS DE CANA DE AÇÚCAR EM CULTIVO
SEMI-SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

FELIPE ANDRES MONSALVE MARIN

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESTATINAS E
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR FUNGOS
ISOLADOS DE CANA DE AÇÚCAR EM CULTIVO
SEMI-SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Marin, Felipe Andres Monsalve.

Avaliação da produção de estatinas e compostos antimicrobianos por fungos isolados de cana de açúcar em cultivo semi-sólido / Felipe Andres Monsalve Marin. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Gabriel Padilla Maldonado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bioprodutos.

Versão do título para o inglês: Production of statins and antimicrobial compounds in solid state fermentation by fungi isolated from sugar cane plants.

1. Bioprocesso 2. Metabolitos secundários I. Maldonado, Prof. Dr. Gabriel Padilla II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0129/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Felipe Andres Monsalve Marin.

Título da Dissertação: Avaliação da produção de estatinas e compostos antimicrobianos por fungos isolados de cana de açúcar em cultivo semi-sólido.

Orientador(a): Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

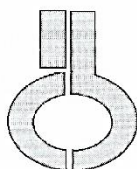
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 692/14 referente ao projeto intitulado: "*Avaliação da produção de estatinas por fungos isolados de cana de açúcar mediante um processo em semi-sólido*" sob a responsabilidade de **Felipe Andres Monsalve Marin**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Aos meus pais, Sigifredo Monsalve e Mariela Marin; a minha irmã Anyela Monsalve Marin,
e a minha família em geral por todo o amor, carinho e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A minha família e amigos na Colômbia, pelo apoio constante, motivação e boas energias. Apesar da distância sempre estiveram ao meu lado.

À Prof^a. Dra. Maria Fernanda Rodriguez, por crer e apoiar a ideia de começar uma aventura no Brasil.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado, pela GRANDE oportunidade de crescimento profissional e pessoal, assim como pela orientação, conselhos, conversas, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. André Tempone e a Daiane Ferreira do Laboratório de Toxicologia Aplicada do Instituto Adolfo Lutz, pela GRANDE colaboração na etapa final do projeto, assim como pelas conversas, amizade e motivação (Vamos que vamos!).

Ao Prof. Dr. Joao Lago e a Simone Grecco do Laboratório de Química Biorgânica da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração nas análises químicas das amostras, e em especial pela vontade de ajudar e contribuir, visando ter os melhores resultados.

A Flavia Damasceno do Laboratório “*Unit for Drug Discovery*” do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela GRANDE colaboração nos ensaios iniciais com *T. cruzi*, e especialmente pela amizade e pelo seu interesse e vontade de discutir, sugerir e trabalhar em equipe.

À Dr. Tatiana Alves Reis do Laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo constante suporte e ajuda nas diversas etapas do projeto.

À Prof^a. Dra. Kelly Ishida do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela colaboração com os ensaios com *Candida albicans*, e em especial pela disposição para discutir e responder as minhas dúvidas. As conversas sempre foram de muita ajuda.

À Prof^a. Dra. Silvia Reni e à técnica Jenicer Yasunaka, do Laboratório de Leishmanioses, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela colaboração com os ensaios com *Leishmania amazonensis*.

Ao Prof. Dr. Magnus Gidlund e à técnica Silvana Eugênio do Laboratório de Imunofisiopatologia, assim como ao Dr. Fernando Almeida do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo apoio nas análises de cromatografia de alta eficiência.

A Gisele Santana, secretária da Pós-graduação do programa de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas/USP, pelo ótimo atendimento, amizade e paciência a minhas constantes perguntas. O seu trabalho é vital para a Pós-graduação.

Ao Laboratório de Bioprodutos, especialmente a Zita Gregorio, Leandro Garrido, Simone Ichiwaki e Renata Furlan.

A Martha Uran e aos amigos da *House 116*, Margarita Muñoz, Mariana Silva, Elisa Chaparro, Carolina Manchola, Marcela Hernandez e Jennifer Salguero; vocês foram a minha família no Brasil.

Aos amigos Taís Kuniyoshi, Lina Lopez, Ivan Acosta, Ivan Pacheco, Felipe Almeida, Lucas dos Santo Dias e Mariana Doprado, pela amizade, alegrias, forças, boas energias, apoio e ajuda.

A todos os professores que contribuíram na minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo junto com o programa de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

MUITO OBRIGADO

MUCHAS GRACIAS

“What we know is a drop, what we don't know is an ocean.”

Isaac Newton

“Hay que unirse, no para estar juntos, sino para hacer algo juntos”.

Juan Donoso Cortés

RESUMO

MONSALVE , F. **Avaliação da produção de estatinas e compostos antimicrobianos por fungos isolados de cana de açúcar em cultivo semi-sólido**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As estatinas são os agentes mais eficazes para a redução de colesterol no tratamento de doenças cardiovasculares, e algumas destas moléculas podem ser produzidas através de processos biológicos como o cultivo semi-sólido de fungos filamentosos. O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade de produção de estatinas e compostos antimicrobianos por cinco cepas de fungos isolados de cana de açúcar. Para isso, extratos obtidos a partir do tratamento dos cultivos fúngicos e do substrato (Farelo de trigo) com uma solução de acetonitrila e água (2:1), foram analisados por métodos analíticos como cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear para determinar a presença ou ausência de estatinas nas amostras. Adicionalmente, os extratos foram testados contra diferentes modelos biológicos incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células de ovário de hamster chinês, e parasitas como *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. De acordo com os resultados obtidos, os cinco fungos avaliados não produzem estatinas, e em relação ao biomonitoramento dos extratos, foi observado que o extrato de farelo de trigo gerou um efeito antiparasitário, que além de ser uma novidade, destaca-se como um resultado positivo que poderia contribuir na busca de compostos para o tratamento de doenças negligenciadas. Os extratos dos cultivos fúngicos também apresentaram atividade antiparasitária, no entanto, não foi possível determinar se os compostos produzidos pelos fungos poderiam gerar efeito obtido, levando em conta que não é possível separar a biomassa fúngica do substrato dos cultivos (farelo de trigo).

Palavras-chave: Estatinas. Cultivo semi-sólido. Antimicrobianos. Fungos filamentosos. Farelo de trigo.

ABSTRACT

MONSALVE, F. **Production of statins and antimicrobial compounds in solid state fermentation by fungi isolated from sugar cane plants.** 2015. 93 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Statins are the most effective cholesterol lowering agents for the treatment of cardiovascular disease, and some of these molecules can be produced through biological process such as the solid state fermentation. The aim of this study was determinate the capability of production of statins and antimicrobials compounds by five strains of fungi isolated from Brazilian sugar cane. For this purpose, extracts obtained from treatment of the fungi cultures and from the substrate (Wheat bran) with a solution of acetonitrile and water (2:1) were analyzed through analytical methods as HPLC and NMR in order to determinate the presence or absence of statins; in addition, the extracts were tested against different biological models including bacteria, yeast, filamentous fungi, chinese hamster ovary cells, and parasites such as *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. According to the results obtained, the five fungal strains tested did not produce statins, and the wheat bran extract produced a biological effect against the parasites, which besides being a novelty, stands out as a positive result that could contribute in the research of new compounds for the treatment of neglected diseases. It was not possible to determine if the fungal strains could produce an antiparasitic activity, considering that it is not possible separated the fungal biomass from the substrate to obtain the extracts.

Keywords: Statins. Solid state fermentation. Antimicrobials. Filamentous fungi. Wheat bran.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química das estatinas.....	16
Figura 2- Estruturas da Lovastatina.....	17
Figura 3- Fluxograma da etapa II da determinação da presença de estatinas nos extratos.....	26
Figura 4- Resultados da análise elementar do farelo de trigo e dos cultivos de fúngicos...	32
Figura 5- Biomassa final dos cultivos fúngicos.....	33
Figura 6- Halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> tratada com o extrato (2 mg/mL) de <i>A. terreus</i>	36
Figura 7- Viabilidade celular dos cultivos de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com os extratos fúngicos.....	41
Figuras 8(x)- Avaliação da atividade de diferentes concentrações dos extratos fúngicos sobre a proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	43
Figuras 9(x)- Avaliação da atividade de diferentes concentrações de acetonitrila sobre a proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	44
Figura 10- Avaliação da atividade de diferentes concentrações do extrato de farelo de trigo sobre a proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	46
Figuras 11(x)- Avaliação da atividade de diferentes concentrações dos extratos fúngicos e do extrato de farelo e trigo sobre a viabilidade das células CHO.....	47
Figuras 12(x)- Imagens de microscópio ótico (20X) das células CHO tratadas com os extratos.....	48
Figuras 13(x)- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações de acetonitrila sobre a viabilidade celular de células CHO.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Imagens dos cultivos (7 dias) dos conídios de <i>Mucor</i> sp. tratados com os extratos.	37
Tabela 2- Imagens microscópicas (20X) das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i> tratadas com o extrato do cultivo do fungo <i>A. terreus</i>	41
Tabela 3- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações dos extratos fúngicos sobre a proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	43
Tabela 4- Avaliação do efeito do acetonitrila sobre a proliferação dos epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	44
Tabela 5- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações dos extratos fúngicos e do extrato de farelo e trigo sobre a viabilidade das células CHO.....	47
Tabela 6- Imagens de microscópio ótico (20X) das células CHO tratadas com os extratos...	48
Tabela 7- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações de acetonitrila sobre a viabilidade celular de células CHO.....	50
Tabela 8- Valores da concentração inibitória de 50 % de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados como as frações do extrato de farelo de trigo, e dos cultivos dos fungos <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Penicillium pinophilum</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>“American Type Culture Collection”</i>
C	<i>Carbono</i>
C-	Controle negativo de inibição de crescimento
C+	Controle positivo de inibição crescimento
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CC ₅₀	Concentração citotóxica 50%
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CE ₅₀	Concentração efetiva a 50%
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CH ₄	Metano
CHO	Células de Ovário de Hamster Chinês
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO-d ₆	Dimetil sulfoxido deuterado
DO	Densidade ótica
FDA	<i>“Food and Drug Administration”</i>
H	Hidrogênio
HMG	3-hidroxi-metilglutaril CoA redutase
IC ₅₀	Concentração inibidora 50%
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LIT	<i>“Liver Infusion Tryptose”</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
P/V	Peso/volume
PKS	Policetídeo sintase
RMN- ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SFB	Soro fetal bovino
TMS	Tetrametilsilano
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Cepas	22
3.1.1 Fungos filamentosos.....	22
3.1.2 Bactérias.....	22
3.1.3 Levedura.....	22
3.1.4 Parasitas.....	22
3.1.4.1 <u>FASE I</u>	22
3.1.4.2 <u>FASE II</u>	23
3.1.5 Células de mamífero.....	23
3.2 Processo de produção das estatinas	23
3.2.1 Inóculo.....	23
3.2.1.1 <u>Método I</u>	23
3.2.1.2 <u>Método II</u>	23
3.2.2 Condições de cultivo em semi-sólido.....	24
3.3 Procedimentos analíticos	24
3.3.1 Determinação da porcentagem de umidade e de biomassa.....	24
3.3.2 Análise elementar (C, N, H) do farelo de trigo e dos cultivos dos fungos <i>Trichoderma</i> sp., e <i>Penicillium pinophilum</i>	24
3.3.3 Obtenção dos extratos.....	25
3.3.4 Determinação da presença de estatinas nos extratos.....	25
3.3.4.1 <u>ETAPA I</u>	25
3.3.4.2 <u>ETAPA II</u>	26
3.3.4.2.1 <i>Cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC)</i>	27
3.3.4.2.2 <i>Cromatografia de alta eficiência (CLAE)</i>	27
3.3.4.2.3 <i>Ressonância magnética nuclear (RMN H⁺)</i>	27
3.3.4.2.4 <i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)</i>	27
3.4 Avaliação da atividade biológica dos extratos	28
3.4.1 Testes de atividade antibacteriana.....	28
3.4.2 Teste de atividade antifúngica sobre <i>Mucor</i> sp.	28

3.4.3	Teste de atividade antifúngica sobre <i>Candida albicans</i>	28
3.4.4	Teste de atividade antiparasitária sobre <i>Leishmania amazonenses</i>	29
3.4.5	Testes de atividade antiparasitária sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
3.4.5.1	<u>FASE I</u>	29
3.4.5.2	<u>FASE II</u>	30
3.4.5.2.1	<i>Cultivo in vitro</i>	30
3.4.5.2.2	<i>Determinação in vitro da concentração efetiva 50% (CE₅₀)</i>	30
3.4.6	Testes de citotoxicidade sobre células de ovário de hamster chins (CHO)	31
3.5	Determinação da espécie da cepa <i>Trichoderma</i> sp. (CBMAI 1018)	31
3.6	Análise estatística	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Análise elementar (C, N, H) do farelo de trigo e dos cultivos dos fungos <i>Trichoderma</i> sp., e <i>Penicillium pinophilum</i>	32
4.2	Obtenção dos extratos	33
4.3	Determinação da presença de estatinas	34
4.3.1	<u>ETAPA I</u>	34
4.3.2	<u>ETAPA II</u>	35
4.4	Avaliação da atividade biológica dos extratos	36
4.4.1	Testes de atividade antibacteriana.....	36
4.4.2	Teste atividade antifúngica sobre <i>Mucor</i> sp.	36
4.4.3	Teste de atividade antifúngica sobre <i>Candida albicans</i>	39
4.4.4	Teste de atividade antiparasitária sobre <i>Leishmania amazonensis</i>	40
4.4.5	Testes de atividade antiparasitária sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> - FASE I.....	42
4.4.6	Testes de citotoxicidade sobre células de ovário de hamster chins (CHO)	46
4.4.7	Testes de atividade antiparasitária sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> - FASE II.....	50
4.5	Determinação da espécie da cepa <i>Trichoderma</i> sp. (CBMAI 1018)	53
5	CONCLUSÕES e RECOMENDAÇÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A – Comparação dos cromatogramas segundo o dia de cultivo.....	61
	APÊNDICE B – Comparação dos cromatogramas segundo o método de extração.....	65
	APÊNDICE C – Comparação dos cromatogramas e espectros de absorção (Extratos vs. Padrão Lovastatina)	69
	APÊNDICE D – Comparação dos cromatogramas ETAPA II (Extratos vs. Padrão Lovastatina)	80
	APÊNDICE E – Espectros de ressonância magnética nuclear das frações da ETAPA II.....	83
	APÊNDICE F – Resultados CG/EM das frações da ETAPA II.....	89

1 INTRODUÇÃO

Os policetídeos fúngicos representam um grupo estruturalmente diverso de moléculas que exibe atividades biológicas importantes tais como antibióticos, imunossuppressores e antihelmínticos. Entre estas biomoléculas encontram-se as estatinas, consideradas como a classe mais importante produzida pela via biossintética policetídeo sintetase (PRAVEEN e SAVITHA, 2012). Estas biomoléculas são inibidores da primeira enzima comprometida na via do mevalonato, a 3-hidroxi-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA), sendo considerada uma enzima chave na via de produção de colesterol (OSMAK, 2012). Estes inibidores podem ser divididos em: estatinas naturais, seus derivados semi-sintéticos, e as estatinas de origem sintética, cujas estruturas são bastante diferentes das estatinas naturais (Figura 1). Apenas o análogo da HMG-CoA, responsável pela inibição da HMG-CoA redutase, é comum entre as estatinas naturais e sintéticas (BARRIOS-GONZÁLES; MIRANDA, 2010).

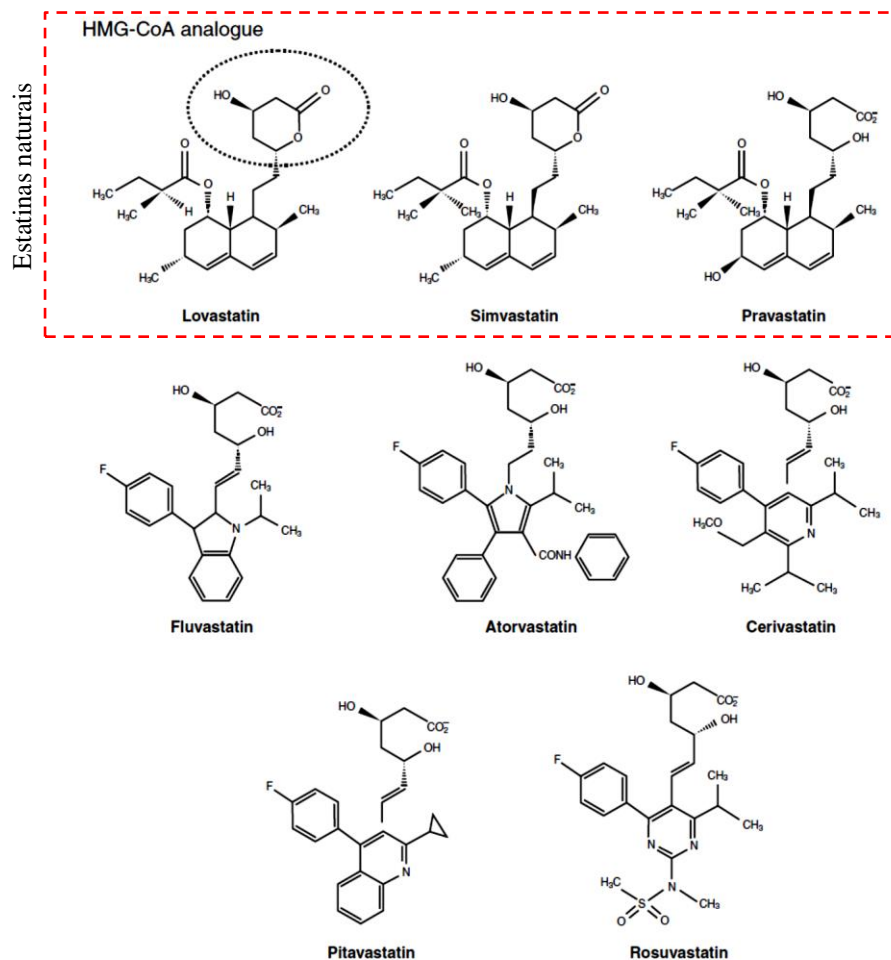


Figura 1- Estrutura química das estatinas (SCHACHTER, 2004).

Dentro do grupo das estatinas naturais destaca-se a lovastatina, que foi a primeira estatina aprovada como medicamento anti-hipercolesterolêmico pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) dos Estados Unidos em 1987 (PANSURIYA e SINGHAL, 2010). Esta biomolécula é um metabólito secundário de origem fúngica que pode apresentar-se de duas formas (Figura 2), a forma lactona e a forma hidróxi-ácida, que é o resultado da modificação da forma lactona e representa a molécula biologicamente ativa da Lovastatina (PEI-LIAN, ZHI-NAN e PEI-LIN, 2007; SAMIEE et al., 2003).

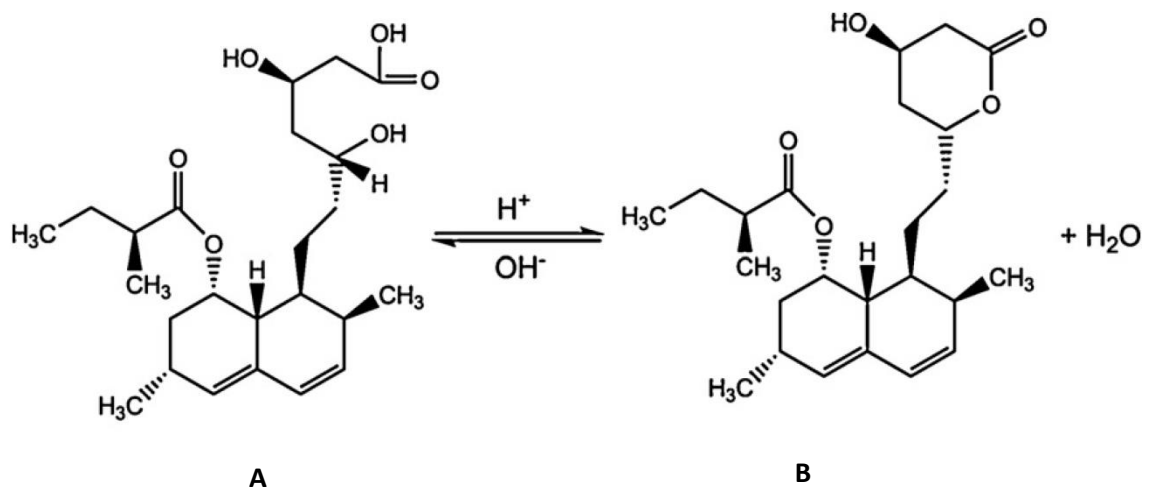


Figura 2- Estruturas da Lovastatina (BIZUKOJC et al., 2012): a) Forma Hidróxi-ácida (molécula ativa); b) Forma lactona (Pró-droga).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 17,3 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares (DCV) em 2008 e prevê-se que 23,6 milhões de pessoas vão morrer no ano de 2030 a causa deste tipo de doenças, sendo prevista para ser a principal causa de morte (WHO, 2013). Uma das razões para esses óbitos é a hipercolesterolemia, e seu tratamento tem como alvo a diminuição da lipoproteína de baixa densidade (LDL), que pode ser atingida por medicamentos quando a dieta e o exercício falham (PRAVEEN e SAVITHA, 2012). Segundo Osmak (2012), as estatinas constituem o princípio ativo de medicamentos tais como: Mevacor® (Lovastatina), Zocor® (Simvastatina), Compactin® (Mevastatina), Lescol® (Fluvastatina), Pravachol® (Pravastatina), Lipitor® (Atorvastatina), Crestor® (Rosuvastatina) e Baycol® (Cerivastatina), sendo os agentes mais eficazes para reduzir o colesterol durante o tratamento de doenças cardiovasculares, o que é refletido no enorme sucesso médico e comercial, gerando bilhões de dólares em vendas anuais (ZHANG et al., 2013b).

A partir do ano 2000, as patentes que cobrem as principais estatinas começaram a expirar, caso da patente da Lovastatina que expirou em 2001, Pravastatina e Simvastatina em 2006, Atorvastatina 2010, Fluvastatina em 2011 e Rosuvastatina em 2012. É previsto que a concorrência com as versões genéricas, juntamente com os avanços tecnológicos irão reduzir os preços das estatinas, tornando-as mais viáveis economicamente (BARRIOS-GONZÁLES; MIRANDA, 2010).

Vários microrganismos têm sido reportados como produtores de Lovastatina, tais como espécies de *Penicillium*, *Monascus*, *Hypomyces*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Eupenicillium*, *Gymnoascus*, *Trichoderma* (JAHROMI et al., 2012). No entanto, apenas linhagens de *Aspergillus terreus* foram implementados com sucesso para a produção em escala industrial, sendo a espécie mais reportada na literatura referente a produção de Lovastatina (PANSURIYA e SINGHAL, 2010). Tradicionalmente, a produção foi realizada mediante cultivos em meio líquido, no entanto, a produção em cultivo semi-sólido surgiu recentemente como uma tecnologia atrativa para a produção de enzimas, esporos e diferentes metabólitos secundários como antibióticos, pigmentos, anticorpos, entre outros, provenientes de fungos e actinomicetes. Embora os cultivos em semi-sólido tenham sido amplamente utilizada desde a antiguidade, nos últimos 20 anos este tipo de técnica de cultivo foi modernizada (BARRIOS-GONZÁLES, 2012), permitindo assim ter um maior controle do processo. Este processo acontece na ausência ou quase ausência de água livre, que assegura o crescimento e metabolismo apropriado dos microrganismos, mas não excede a capacidade máxima de retenção de água da matriz sólida (SCHMIDT e FURLONG, 2012). Estas são condições semelhantes ao meio ambiente natural no qual estes microrganismos estão adaptados (HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2006). Vários estudos comparativos demonstraram que os cultivos em semi-sólido apresenta vantagens sobre os cultivos em meio líquido, como: i) a obtenção de maior produtividade e rendimento em menor tempo, ii) maior concentração e estabilidade do produto, menor custo do substrato, iii) menor consumo de água e energia no processamento “up-stream” e no processamento “downstream” (HU et al., 2011; JAHROMI et al., 2012; VALERA et al., 2005). A FDA aprovou os cultivos de microrganismos em semi-sólido como processo para a produção de medicamentos de origem fúngica, e recentemente a companhia biofarmaceutica Biocon India Ltd, começou a produzir diferentes metabólitos por cultivos deste tipo em escala industrial, incluindo a Lovastatina.

Podem distinguir-se dois tipos de sistemas de cultivo em semi-sólido segundo a natureza da fase sólida usada: a) Cultivos sobre substratos naturais, que é o sistema mais comum, e b) Cultivos em suportes inertes impregnados com meio de cultura líquido. A

empresa Biocon India Ltd. produz Lovastatina usando o primeiro tipo de sistema de produção mencionado, cultivando a cepa *A. terreus* em farelo de trigo, que tem a função de suporte e de substrato (BAÑOS et al., 2009). Diferentes substratos naturais estão sendo avaliados para a produção de Lovastatina incluindo: grãos de sorgo, farelo de trigo, arroz e resíduos agroindustriais, cujo processamento inclui a queima para a eliminação e/ou geração de energia, compostagem, alimento para ruminantes, entre outros (VARELA et al., 2005). Estes resíduos são potenciais substratos econômicos para a produção de produtos de interesse biotecnológico.

Estudos recentes apontando efeitos pleiotrópicos das estatinas vêm despertando interesse da comunidade médica (MIHOS e SANTANA, 2011). Estes efeitos são atribuídos a vários processos que resultam da inibição da HMG-CoA redutase, incluindo outros efeitos como: anti-inflamação, imunomodulação, neuroprotecção (contra doença de Alzheimer; doença de Parkinson), melhoramento do metabolismo ósseo (contra esclerose múltipla) e atividade antitumoral (WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2013a). Além das aplicações clínicas, outros estudos demonstraram que a Lovastatina tem efeitos positivos na mitigação de emissões de metano (CH_4) de origem entérico, produzido por arqueas metanogênicas em ruminantes. A produção de metano ruminal tem impacto ambiental negativo e representa entre 2 e 15% de perda de energia na dieta dos animais hospedeiros. Outros agentes atenuadores como ácidos orgânicos, ionóforos, ácidos graxos, e vacinas, foram testados, mas tem uma limitada aplicação, principalmente porque, além de suprimir a produção de metano, diminuem a digestibilidade de nutrientes, tendo um efeito negativo sobre a saúde humana e animal, ou não sendo economicamente aceitáveis (JAHROMI et al., 2012; WOLIN e MILLER, 2006).

Os produtos de origem natural são de grande importância na descoberta de fármacos e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de diferentes tipos de doenças, sendo os fungos e os actinomicetes as fontes principais da área microbiológica (HARVEY, 2008). Muitas vezes estes tipos de compostos são biologicamente mais amigáveis, devido a sua co-evolução com os locais alvos em sistemas biológicos, isto como consequência das interações entre os organismos e o seu ambiente (MISHRA e TIWARI, 2011). Recentemente, os esforços de pesquisas de produtos naturais perderam popularidade em muitas das principais empresas farmacêuticas e, em alguns casos, foram substituídas pela triagem de alto rendimento de compostos, e a disponibilidade de bibliotecas de compostos gerados por química combinatória (GULLO e HUGHES, 2005). Esta perda de interesse poderia ser atribuída ao enorme esforço e despesa que é necessário para escolher uma fonte biológica, isolar os compostos ativos, decifrar suas estruturas, e começar o longo caminho para o

desenvolvimento de produtos (HARVEY, 2008; STROBEL e DAISY, 2003). Segundo Rishton (2008), a triagem de produtos naturais tem sido considerada por muitos como impraticável e obsoleta na arena da triagem bioquímica moderna, no entanto deve-se salientar que os produtos naturais oferecem uma diversidade incontável de estruturas químicas inigualáveis, cujo efeito pode ser melhorado mediante o uso de processos químicos (STROBEL e DAISY, 2003).

Atualmente há uma chamada geral para o desenvolvimento de novos antibióticos, agentes quimioterápicos e drogas mais eficazes no tratamento de infecções negligenciadas, o que é de especial interesse no Brasil, a nação do hemisfério ocidental líder em termos do número de seus cidadãos vivendo com doenças tropicais negligenciadas (20 milhões), como a doença de Chagas, leishmaniases em suas duas formas (cutânea e visceral), esquistossomose, filariose linfática, lepra e malária (HOTEZ e FUJIWARA, 2014).

Em vista da importância que representam as estatinas em diversas áreas, o presente projeto tem como base os resultados prévios obtidos na tese de Doutorado de Rojas (2010), realizada no Laboratório de Bioprodutos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Neste trabalho foram triados fungos isolados de cana de açúcar, selecionando um grupo em particular pela presença de sequências similares a genes policetídeo sintetase (PKS), especificamente do grupo monofilético dos PKS envolvidos na produção de policetídeos reduzidos, como a Lovastatina. Os resultados ofereceram fortes indícios quanto à possibilidade de produzir estatinas, especialmente a Lovastatina, razão pela qual pretende-se avaliar a capacidade dos fungos filamentosos selecionados para produzir este tipo de molécula, assim como avaliação da co-produção de compostos antimicrobianos, considerando que nos processos biológicos podem ser produzidos diferentes tipos de compostos simultaneamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de produção de moléculas tipo estatinas por fungos filamentosos isolados de cana de açúcar mediante um cultivo em semi-sólido.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir os extratos brutos a partir do cultivo em semi-sólido do grupo de fungos filamentosos selecionados assim como da matriz utilizada como suporte e substrato.
- Avaliar a atividade biológica dos extratos obtidos frente a cepas de bactérias, fungos, parasitas, e células de mamífero.
- Selecionar os extratos que apresentem as atividades biológicas mais representativas visando purificar e caracterizar as biomoléculas de interesse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas

3.1.1 Fungos filamentosos

As cepas fúngicas utilizadas neste estudo foram: **1)** Cepa controle *Aspergillus terreus* (CBMAI 0193) da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada na cidade de Campinas – Brasil; **2)** Grupo de fungos isolados de cana de açúcar pelo Laboratório de Bioprodutos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e posteriormente depositados na CBMAI: *Saccharicola* sp. (CBMAI 1030); *Fusarium* sp. (CBMAI 1015); *Trichoderma* sp. (CBMAI 1018); *Aspergillus flavus* (CBMAI 1023) e *Penicillium pinophilum* (CBMAI 1022). Para o teste de atividade antifúngica foi utilizada a cepa de *Mucor* sp. do Laboratório de Bioprodutos do Departamento de Microbiologia do ICB/USP.

3.1.2 Bactérias

Foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* (ATCC 13706) e *Bacillus subtilis* do Laboratório de Bioprodutos do Departamento de Microbiologia do ICB/USP.

3.1.3 Levedura

Foi utilizada a cepa *Candida albicans* SC5314 do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica do Departamento de Microbiologia do ICB/USP.

3.1.4 Parasitas

3.1.4.1 FASE I

Foram utilizadas as cepas CL14 de *Trypanosoma cruzi* do Laboratório “Unit for Drug Discovery” do Departamento de Parasitologia do ICB/USP; e a cepa M2269 de *Leishmania amazonensis* do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB/USP.

3.1.4.2 FASE II

Foi utilizada a cepa *Y* de *Trypanosoma cruzi* do Laboratório de Toxicologia Aplicada do Departamento de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, localizado na cidade de São Paulo, Brasil.

3.1.5 Células de mamífero

Foi utilizada a linha celular de Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K₁) do Laboratório “Unit for Drug Discovery” do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, usada como padrão nos protocolos dos testes de citotoxicidade do laboratório mencionado.

3.2 Processo de produção das estatinas

Para avaliar a capacidade de produção de estatinas do grupo de fungos filamentosos selecionados, foram realizados cultivos em estado semi-sólido nas mesmas condições de cultivo (temperatura, umidade, substrato), utilizando a linhagem *Aspergillus terreus* (CBMAI 0193) como controle positivo, descrita em numerosos estudos como produtora de Lovastatina (BARRIOS-GONZALES, 2012).

3.2.1 Inóculo

3.2.1.1 Método I (*Metodologia proposta por Quevedo et al. 2012*)

Foi realizado inóculo de um grama (1 g) da biomassa obtida do cultivo estático de cada um dos fungos em Erlenmeyers de 250 mL com 50 ml de caldo farelo de trigo (175 g/L). O tempo de incubação foi de 15 dias a 28 °C.

3.2.1.2 Método II

Inoculação de 10 discos de ágar (5 mm) farelo de trigo com o fungo crescido, obtidos de cultivos em placa a 28 °C durante 7 ou 15 dias, dependendo das características de crescimento de cada fungo.

3.2.2 Condições do cultivo semi-sólido

(O farelo de trigo foi selecionado como substrato e suporte dos cultivos, e foi obtido do mercado local da cidade de São Paulo, Brasil).

Foram colocados 10 gramas do farelo de trigo em Erlenmeyers de 250 ml, autoclavando o material a 121 °C durante 40 minutos. O inóculo foi adicionado ao meio de cultivo estéril, e o conteúdo de umidade foi ajustando entre 60 e 65%. O tempo de incubação avaliado para cada fungo foi de 7 e 15 dias, a 28 °C, com porcentagens de umidade relativa entre 85 e 90% (câmara úmida). Como controle abiótico dos experimentos, 10 gramas de farelo estéril foram incubados nas mesmas condições de cultivo dos fungos.

3.3 Procedimentos analíticos

3.3.1 Determinação da porcentagem de umidade e de biomassa

Na determinação da umidade final dos cultivos, 10 gramas de cada cultivo (mistura de farelo de trigo com o fungo crescido) foram secos a 40 °C durante 48 horas. A porcentagem de umidade foi determinada segundo a fórmula descrita por Baños et al., (2009):

$$\% \text{ de umidade} = \frac{\text{Massa de amostra úmida} - \text{Massa da amostra seca}}{\text{Massa de amostra úmida}} \times 100$$

No cálculo foi considerada a umidade inicial do farelo de trigo, e assim como as alterações geradas na etapa de esterilização (autoclavagem).

A biomassa foi determinada segundo a diferença dos valores de peso seco do final dos cultivos em relação ao peso seco inicial.

3.3.2 Análise elementar (C, N, H) do farelo de trigo e dos cultivos dos fungos

Trichoderma sp., e *Penicillium pinophilum*.

Segundo o protocolo da Central Analítica do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo, 1 mg das amostras pesadas em balança analítica em um cadinho de estanho, foram lacradas e foram introduzidas no Analisador Elementar (Perkin-Elmer Modelo 240 CHN series II) o qual é submetido a combustão em atmosfera de oxigênio puro

na presença de gás hélio como arraste a 925 °C. Os gases produzidos, Gás Carbônico, Água e Óxidos de Nitrogênio, são arrastados até um tubo contendo Cobre puro, no qual os óxidos de Nitrogênio são reduzidos à gás Nitrogênio. Estes gases são separados em coluna cromatográfica e detectados por Detector de Condutividade Térmica e comparados os sinais produzidos com padrões previamente analisados. O resultado produzido se dá em porcentagem de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio.

3.3.3 Obtenção dos extratos

Foram avaliados dois protocolos para obter os extratos dos cultivos fúngicos e do controle de farelo de trigo. No primeiro protocolo, 10 gramas dos cultivos foram tratados com nitrogênio líquido e triturados em morteiro até formar uma pasta. No segundo protocolo, 10 gramas dos cultivos foram secos a 40 °C durante 48 horas, e triturados em mortero até formar pó. Três gramas de cada um dos materiais obtidos pelos procedimentos mencionados foram tratados com uma solução de acetonitrila e água (2:1), e sonicados em banho ultrassônico (25 kHz) durante 30 minutos. Após, as misturas obtidas foram agitadas durante 12 horas, e centrifugadas a 5000 g, a 4 °C, durante 20 minutos. Os pellets foram descartados e os sobrenadantes foram filtrados em filtros de celulose regenerada de 47 mm de diâmetro e poro com diâmetro de 0,45 µm. Posteriormente, os extratos filtrados foram concentrados a 45 °C em rotaevaporador e armazenados a 4 °C.

3.3.4 Determinação da presença de estatinas nos extratos

3.3.4.1 ETAPA I

As amostras concentradas foram resuspendidas em 2 mL de acetonitrila 100% e analisadas mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando um sistema Shimadzu Prominence equipado com um detector Diode Array e uma coluna Novapack C18 (250 × 4.6mm i.d., 5 µm); No método de gradiente desenvolvido, o tempo das corridas foi de 70 minutos, com uma fase móvel de acetonitrila e água, e com um fluxo de 0,8 mL/min. Como controles foram utilizadas soluções padrão de Lovastatina (50 µl/mL) comercial Merck (Merck S.A., São Paulo, SP., Brasil) em sua forma lactona (Prodroga) e em sua forma hidróxiácida (forma ativa da molécula) que foi gerada a partir da forma lactona utilizando a metodologia proposta por Friedrich et al. (1995).

3.3.4.2 ETAPA II

Baseando-se nas análises dos cromatogramas obtidos na etapa I, e dos resultados da atividade biológica dos extratos, foram selecionados os extratos dos cultivos dos fungos *Trichoderma* sp. e *Penicillium pinophilum*, e o extrato de farelo de trigo (controle) para assim dar continuidade nos testes de caracterização das amostras, visando caracterizar as amostras e purificar frações de interesse. Os extratos foram produzidos segundo as condições de cultivo já padronizadas, e foram fracionados em colunas Sep-Pak C18 da Waters. A lavagem das colunas foi realizada inicialmente com 10 mL de acetonitrila 100%, seguido de 15 mL acetato de etila 100%; gerando assim duas frações por cada extrato (Figura 3). As seis frações obtidas foram concentradas e analisadas em colaboração com o Laboratório de Química Biorgânica da UNIFESP coordenado pelo Professor Doutor Joao Lago, através de técnicas analíticas como cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), CLAE, Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), e Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H).

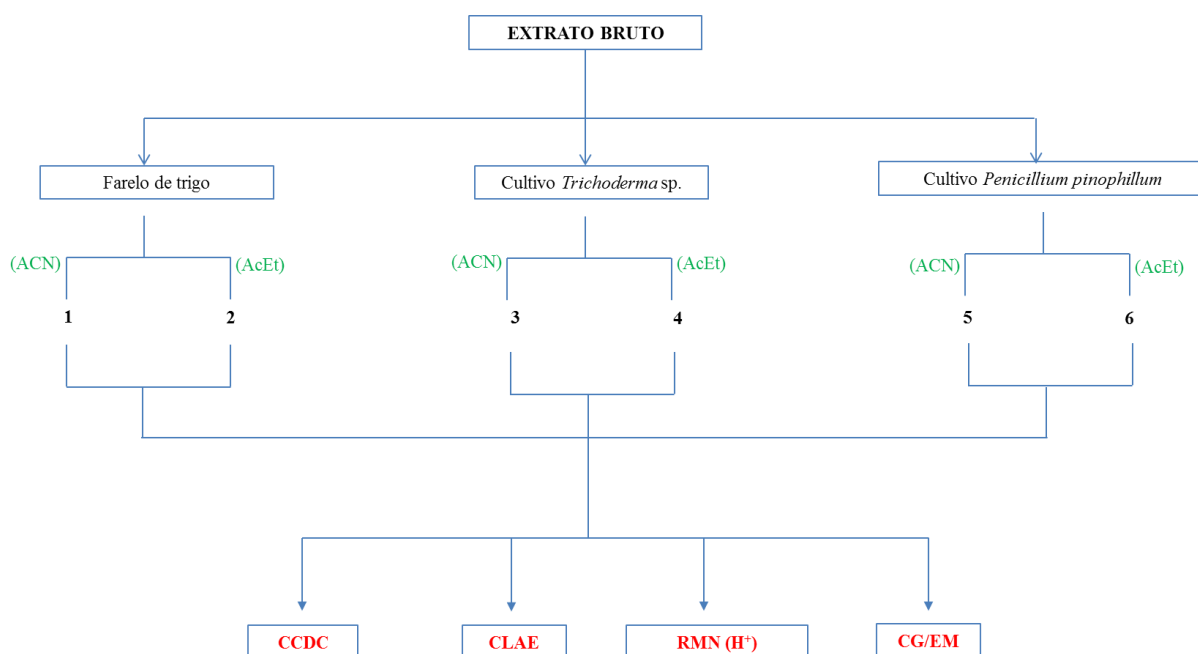


Figura 3- Fluxograma da etapa II da determinação da presença de estatinas nos extratos. Acetonitrila (ACN); Acetato de etila (AcOEt); Cromatografia de camada delgada (CCDC); Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM); Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H).

3.3.4.2.1 *Cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC)*

As placas de cromatografia em camada delgada comparativa foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica 60 F254 sob suporte de alumínio da Merck, e o sistema de solventes foi Hexano: Acetato de etila (7:3). Nas revelações das placas foram utilizadas, irradiação no ultravioleta (254 e 356 nm), solução aquosa ácida de sulfato cérico (2,6 mg/mL) e vapores de iodo.

3.3.4.2.2 *Cromatografia de alta eficiência (CLAE)*

As amostras filtradas foram analisadas mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando um sistema Shimadzu Prominence equipado com um detector Diode Array e uma coluna CLC-C8 (250 × 4,6mm i.d., 5 µm); No método desenvolvido gradiente, o tempo das corrida foi de 50 minutos com uma fase móvel de acetonitrila e água (2:1), com um fluxo de 1,0 mL/min.

3.3.4.2.3 *Ressonância magnética nuclear (RMN-H⁺)*

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H foram registrados em espectrômetro Ultrashield 300 Bruker advance III operando a 300 MHz. Como solvente foi utilizado Dimetil sulfoxido deuterado (DMSO-d₆) com tetrametilsilano (TMS).

3.3.4.2.4 *Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)*

Todas as análises foram realizadas em aparelho Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, equipado com injetor tipo “split”, coluna Rtx-5MS (sílica fundida, 30 m, 0,25 mm D.I., 0,25 µm de espessura de filme; Restek, Co., EUA) e detector por ionização em chama acoplado a um detector de massas com fragmentação por impacto de elétrons a 70 eV. Os parâmetros operacionais foram: temperatura do detector e injetor de 280 °C. A temperatura da coluna de 180 °C por 10 min foi programada a 2 °C/min até 210 °C e 10 °C/min até 280 °C por 2 min. A pressão do gás de arraste (He) foi ajustada de modo a obter velocidade linear de 25,0 cm/s (1,0 mL/min). A vazão na purga do septo foi mantida em 1,0 mL/min. O parâmetro testado na CG-EM foi temperatura inicial da coluna, 180 °C [Gradiente 1: 180 °C (10') + 2 °C/min até 210 °C (20') + 10 °C/min até 280 °C (2')].

3.4 Avaliação da atividade biológica dos extratos

3.4.1 Testes de atividade antibacteriana

As bactérias foram cultivadas em caldo Mueller Hinton a 37 °C, 150 rpm, durante 10 horas. Alíquotas de 100 µL das diluições dos cultivos com uma densidade ótica de 0,2 a 600 nm foram inoculadas, e espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri com agar Muller Hilton. Posteriormente, foram colocados sobre a superfície do ágar vários discos de papel filtro estéril de 5 mm de diâmetro que foram impregnados com 10 µL de cada extrato fúngico (2 mg/mL), e com o controle de acetonitrila 100% e do extrato de farelo de trigo (2 mg/mL). As placas foram incubadas durante 10 horas a 37 °C, monitoradas a cada 2 horas.

3.4.2 Teste de atividade antifúngica sobre *Mucor* sp.

A partir de uma placa de Petri com o fungo *Mucor* sp. crescido sobre ágar Sabouraud durante 15 dias a 28 °C, foi feita uma suspensão de conídios utilizando 10 mL de uma solução 0,85% (P/v) de Cloreto de sódio (NaCl), cujo número foi determinado com a contagem em câmara de Neubauer, e ajustado mediante diluições até obter uma concentração final de 1×10^6 conídios/ml. Alíquotas de 100 µL da suspensão de conídios foram inoculadas, e espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri com ágar Sabouraud. Após, na superfície das placas foram colocados canudos de 5 mm de diâmetro, que foram inoculados com 50 µL de cada extrato concentrado, e com 50 µL dos extratos a 2.0 mg/mL. Como controles foram utilizados o acetonitrila 100% e extrato de farelo de trigo a 2.0 mg/mL. As placas foram incubadas durante 7 dias a 28 °C, monitoradas a cada dia.

3.4.3 Teste de atividade antifúngica sobre *Candida albicans*

(Metodologia padrão do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica do Departamento de Microbiologia do ICB/USP)

O ensaio foi feito segundo o método de microdiluição em caldo para o estudo de susceptibilidade antifúngica de leveduras (CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008). Em microplaca de 96 poços de fundo chato, as leveduras foram tratadas com os extratos (2,0 – 0,1 mg/mL) diluídos em série 1:2, incubadas a 35 °C durante 48 horas, utilizando como controle positivo de inibição do crescimento o fármaco padrão fluconazol

(64 µg/mL); os controles adicionais foram o extrato de farelo de trigo (2 mg/mL), o acetonitrila 100%, leveduras sem tratar e meio de cultura (RPMI) sem inocular.

3.4.4 Teste de atividade antiparasitária sobre *Leishmania amazonensis*

(Metodologia padrão do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB/USP)

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações (0,2 mg/mL e 2,0 mg/mL) dos extratos (fúngicos e do farelo de trigo) sobre a proliferação de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em uma concentração de 3×10^6 parasitas/mL; os controles foram parasitas não tratados e parasitas tratados com acetonitrila 100%. Isto foi feito em meio 199, incubando em microplacas de 96 poços, a 25 °C durante 48 horas. Após o tempo de incubação, acrescentou-se em cada um dos poços 30 µL de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), incubando por 2 horas a 25 °C. Por último, adicionaram 50 µL de SDS 20% e foi feita a leitura de densidade ótica no comprimento de onda de 595 nm, e de 690 nm como comprimento de onda de referência. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagens de sobrevivência relacionados com os controles de proliferação de parasitas não tratados com os extratos, os que seriam equivalentes a 100% de viabilidade celular.

3.4.5 Teste de atividade antiparasitária sobre *Trypanosoma cruzi*

3.4.5.1 FASE I

(Metodologia padrão do Laboratório “Unit for Drug Discovery” do Departamento de Parasitologia do ICB/USP)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* na fase exponencial de proliferação ($5,0 - 6,0 \times 10^7$ parasitas/mL) foram cultivados em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 28 °C. Alíquotas com $2,5 \times 10^6$ parasitas/mL foram transferidas a microplacas de 96 poços, cultivadas em meio LIT e tratadas com diferentes concentrações dos extratos (2,0 – 0,2 mg/mL), atingindo um volume final de 1 mL; cada experimento foi feito em quadruplicata. A proliferação celular foi quantificada mediante leituras de densidade ótica (DO) a 620 nm durante 8 dias. A DO foi convertida em valores de densidade celular (parasitas/mL) usando a equação da regressão linear previamente obtida em testes de proliferação. Como controle positivo de inibição da proliferação foi utilizada uma solução de Rotenona (60 µM) e Antymicina (0,5 µM).

Adicionalmente foram feitos controles com extrato de farelo de trigo (0,33 – 1,34 mg/mL), acetonitrila (0,1-1,0 μ M) e parasitas não tratados.

3.4.5.2 FASE II

(Protocolo padrão do Laboratório de Toxicologia Aplicada do Departamento de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz).

3.4.5.2.1 *Cultivo in vitro*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em células LLC-MK2 com meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SFB a temperatura de 37 °C em estufa com 5% CO₂ (KESPER et al., 2000; REIMÃO et al., 2008).

3.4.5.2.2 *Determinação in vitro da concentração inibitória 50% (IC₅₀)*

Os extratos selecionados segundo os resultados obtidos na etapa II da “Determinação da presença de estatinas nos extratos”, foram dissolvidos em Dimetil sulfóxido (DMSO), e diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações (diluição seriada em base 2) a partir de uma concentração inicial de 300 μ g/mL; após, foram e incubados com os parasitas para se determinar as respectivas IC₅₀. A concentração do solvente não ultrapassou 0,5% para não causar danos aos parasitas.

As amostras foram diluídas em série utilizando-se meio RPMI-1640, sem adição de antibióticos em placas de 96 poços e em seguida formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas na concentração de 1×10^6 parasitas/poço. As placas foram mantidas à temperatura de 37 °C em estufa com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período para a determinação da viabilidade dos parasitas, foi adicionado 20 μ L de Alamar Blue® a 10%. As placas permaneceram incubadas por mais 20 horas sobre as mesmas condições.

Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorbância em espectrofluorímetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 570 nm (Gehrke et al., 2013). Como controle positivo de inibição (100% de células mortas), utilizou-se o fármaco padrão Benzonidazol, devido sua utilização na terapia clínica; e como controle negativo de inibição (100% de células vivas), utilizaram-se as células não tratadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.6 Testes de citotoxicidade sobre Células de Hamster Chines (CHO)

(Metodologia padrão do Laboratório “Unit for Drug Discovery” do Departamento de Parasitologia do ICB/USP)

As células foram cultivadas durante 48 horas a 37 °C com uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂, no meio de cultura RPMI suplementado com 0,15% (P/v) Na₂CO₃, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de SFB inativado com calor. Alíquotas de 5,0 x 10⁵ células/mL foram transferidas a placas de 24 poços, e cultivadas em meio RPMI com diferentes concentrações dos extratos fúngicos (2,0 – 1,0 mg/mL), do extrato de farelo de trigo (1,34 – 0,67 mg/mL) e do acetonitrila (0,1 – 0,7 µM), atingindo um volume final por poço de 500 µL. A viabilidade celular foi determinada com o ensaio de MTT após 48 horas de incubação, no qual foram adicionados 50 µL de MTT (5mg/mL) a cada um dos poços, incubando por 3 horas. Após, foram adicionados 200 µL de SDS 10% e foi feita a leitura da DO no comprimento de onda de 595nm.

3.5 Determinação da espécie da cepa *Trichoderma* sp. (CBMAI 1018)

(Metodologia padrão do Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Microbiologia do ICB/USP)

A determinação da espécie do fungo *Trichoderma* sp. (CBMAI 1018) foi feita pelo Laboratório de Micotoxinas do ICB/USP, mediante a análise do sequenciamento do fragmento da região ITS, realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP). A separação eletroforética em capilar foi realizada em um sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), e as sequências consenso foram obtidas usando o programa CodonCode Aligner Versão 3.7.1. (CodonCode Corporation, Centerville, MA, EUA). A sequência obtida foi pesquisada no BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) de forma a confirmar identificações preliminares.

3.6 Análise estatística

O programa *GraphPadPrism5* foi utilizado para construção dos gráficos e seus ajustes, segundo os resultados obtidos nos ensaios com *T. cruzi*, e com as células CHO. O método ANOVA de uma via seguido do teste Dunnett's foi utilizado nas análises estatísticas dos tratamentos em relação ao controle não tratado. Para análise de diferença de grupos foi utilizado o teste Dunnett's. O valor de p<0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise elementar do farelo de trigo e dos cultivos dos fungos *Trichoderma* sp., e *Penicillium pinophilum*

Segundo os resultados da análise elementar (Figura 4) das amostras de farelo de trigo autoclavado e de farelo sem autoclavar, o processo de esterilização não alterou as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio do substrato. No caso da comparação entre as amostras iniciais (dia zero) e finais (dia 7) dos cultivos dos fungos *Trichoderma* sp., e *Penicillium pinophilum*, foi observado que as porcentagens dos elementos (C;H;N) não apresentaram diferenças significativas. A composição geral do farelo de trigo é descrita na revisão feita por Apprich et al. (2014): Água (12%); proteína (13,2 – 18,4%); graxas (3,5 – 3,9%); carboidratos totais (56,8%); ácidos fenólicos (1%); e cinzas (3,4 – 8,1%); ressaltando que os valores podem ter variações conforme à origem do farelo.

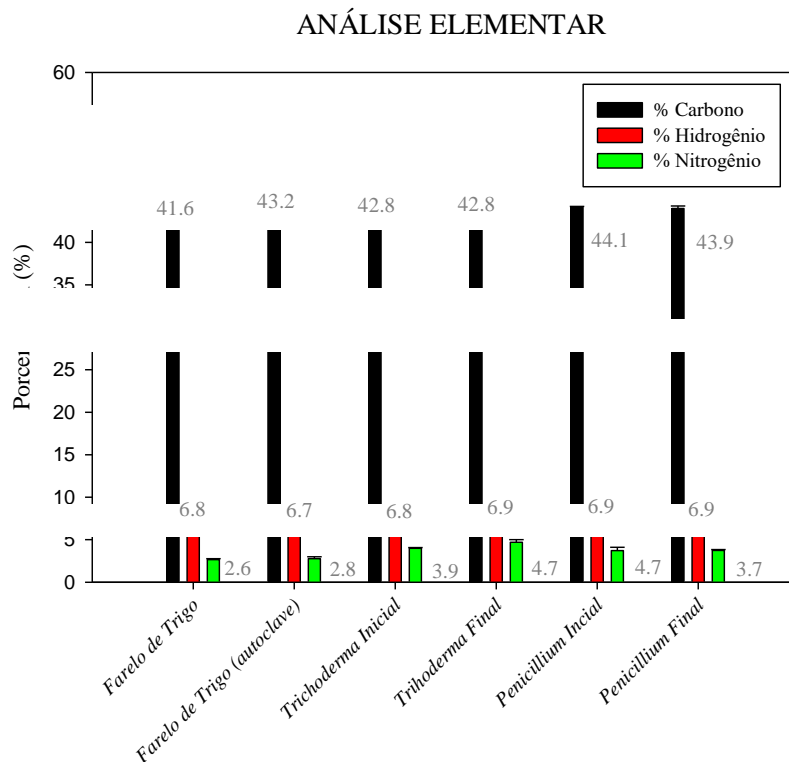


Figura 4- Resultados do análises elementar (Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio) das amostras de farelo de trigo (autocolavado e sem autoclavar), e das amostras iniciais (dia zero) e finais (dia 7) dos cultivos dos fungos *Trichoderma* sp., e *Penicillium pinophilum*.

Os resultados obtidos nas análises são similares aos resultados descritos no trabalho de Locci et al. (2008), no qual foram realizadas análises elementares de farelo trigo tratado com o fungo filamentosos *Pleurotus ostreatus*. Apresentaram no dia zero de cultivo: 41,33% C;

7,95% H; 2,92% N; e do dia 15 de cultivo: 41,60% C; 8,51% H; 3,08% N. Apenas no dia 54 de cultivo foi observada uma diminuição na porcentagem de carbono das amostras (LOCCI et al., 2008).

4.2 Obtenção dos extratos

A produção dos extratos foi padronizada segundo os resultados obtidos a partir das variações nas condições de cultivo (tipo de inóculo e tempo de incubação) dos fungos, assim como dos valores de biomassa obtida e do tipo de procedimento utilizado na extração dos metabólitos intracelulares. Para isto, a principal ferramenta de comparação foram os perfis dos cromatogramas dos extratos produzidos. Baseando-se no anterior, foi determinado que entre tipos de inóculos avaliados, o inóculo com discos Agar com os fungos crescidos foi a forma mais prática, simples e efetiva, levando em conta o tempo total necessário no processo de produção (duas semanas a menos com este tipo de inóculo), assim como os recursos, materiais e trabalho requerido na montagem dos experimentos.

Na comparação dos tempos de cultivo utilizando discos de Agar com os fungos crescidos como inóculo, foram obtidos valores superiores de biomassa aos 15 dias de incubação com a exceção do cultivo do fungo *Trichoderma* sp. (Figura 5). No entanto ao comparar os cromatogramas foi observado que os perfis dos extratos obtidos aos 7 e 15 dias de cultivo apresentaram mínimas diferenças (Apêndice A). É por isso que ao considerar a possibilidade de reduzir o tempo do processo de duas semanas para uma semana sem ter um efeito negativo na produção, foi determinado que os extratos a serem analisados, serão aqueles obtidos do sétimo dia de cultivo.

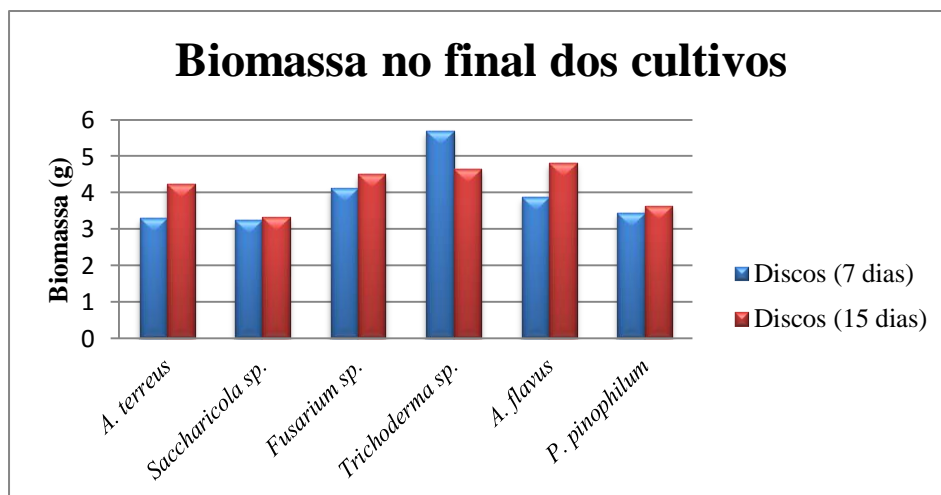


Figura 5- Representação dos valores (gramas) de biomassa obtida ao final dos cultivos fúngicos, calculados segundo a diferença de peso seco. (Azul= 7 dias de cultivo; Vermelho= 15 dias de cultivo).

Para determinar os valores de biomassa formada neste tipo de cultivos são necessários métodos indiretos (DESGRANGES, VERGOIGNAN e GEORGES, 1991) tais como: medidas de constituintes celulares como a quitina ou ergosterol; quantificação de ácidos nucleicos; atividades enzimáticas, taxas de respiração, entre outros; já que não é possível separar o substrato do fungo. Os dados de biomassa obtido ao final dos cultivos é relativo, levando em conta que no cálculo da diferença das massas foi descontado a massa inicial do farelo de trigo (10 gramas), valor que poderia ser menor considerando que o farelo de trigo além de ser o suporte para o crescimento dos fungos, é o substrato.

Na avaliação do tipo de procedimento para a extração dos metabólitos, foi determinado que secagem das amostras a 40 °C seria o procedimento mais favorável para o processo de extração em comparação ao uso de nitrogênio líquido. Segundo as observações dos perfis dos cromatogramas (Apêndice B), o tratamento das amostras com temperatura permite obter extratos mais “limpos”, o que é de grande importância nas etapas de detecção e purificação dos metabólitos de interesse.

4.3 Determinação da presença de estatinas

4.3.1 ETAPA I

Para determinar a presença de estatinas nos extratos, foram feitas análises de cromatografia de alta eficiência (CLAE) comparando os perfis dos cromatogramas das soluções padrão de Lovastatina em suas duas formas (prodroga e forma ativa) com os perfis dos cromatogramas dos extratos (Apêndice C). O extrato do fungo controle *A. terreus*, como era esperado, apresentou frações no mesmo tempo de retenção das soluções padrão; estas frações também apresentaram o mesmo perfil de espectro de absorção em comparação aos padrões (Apêndice C), o que acrescenta as possibilidades de que estas frações correspondam à Lovastatina, embora para ter certeza ainda são necessárias outras análises para determinar características físico-químicas da molécula. Com a exceção do extrato do cultivo de *Fusarium* sp., os extratos dos cultivos fúngicos apresentaram frações em tempos de retenção próximos ao padrão da forma lactona (prodroga) da Lovastatina. No entanto ao comparar os espectros de absorção, os perfis são totalmente diferentes ao espectro de absorção do padrão, o que poderia ser um indício de que aquelas frações não correspondem à Lovastatina.

4.3.2 ETAPA II

Nesta etapa, o extrato de farelo de trigo e os extratos dos cultivos dos fungos *Trichoderma* sp. e *Penicillium pinophilum* foram selecionados para fazer análises que permitissem confirmar a presença ou não de estatinas nas amostras. O primeiro passo desta etapa foi produzir novos extratos segundo as condições já padronizadas. Adicionalmente, as amostras foram fracionadas por colunas Sep-Pak C18, com o objetivo de limpar e fracionar os extratos segundo a polaridade de seus compostos. No total foram obtidas 6 frações (2 por cada extrato) que foram analisadas por CLAE. Segundo as análises dos novos perfis dos cromatogramas (Apêndice D), as amostras não apresentaram frações próximas aos tempos de retenção das soluções padrão de Lovastatina, o que é um resultado diferente do observado nos cromatogramas da ETAPA I, o que poderia ser consequência do fracionamento das amostras nas colunas Sep-Pak, além das modificações no desenho do método para as corridas, incluindo a troca da coluna C18 por uma C8. No entanto, para confirmar isso, foram feitas análises de CCDC, RMN e GC em colaboração com o Laboratório de Química Biorgânica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) coordenado pelo Professor Doutor João Lago.

Ao comparar os espectros das análises de RMN (Apêndice E) das 6 frações com os resultados obtidos no trabalho de Holzgrabe, Diehl e Wawer (1998), as amostras não apresentaram sinais característicos de moléculas como a Lovastatina, o que confirma os resultados obtidos no análises de CLAE.

Adicionalmente, foram detectados sinais característicos de outros tipos de compostos tais como: cetonas, lipopolissacarídeos e principalmente ácidos graxos, os quais não são detectados nas condições utilizadas nos análises de cromatografia de alta eficiência. Considerando interferência da presença dos ácidos graxos nas amostras, foi selecionado o extrato de cultivo de *Trichoderma* sp. para ser fracionado em 60 frações utilizando uma coluna Sephadex LH-20, já que foi o extrato com a maior massa disponível (100 mg) para as análises posteriores; isto gerou a necessidade de determinar a espécie do fungo para assim ter ferramentas que contribuam na discussão dos resultados. As frações foram analisadas por CCDC e segundo os resultados foram selecionadas as frações 4, 8, 12 e 13 para serem analisadas por RMN-¹H. Os espectros das frações 12 e 13 apresentaram melhor resolução, no entanto as graxas ainda permaneceram presentes, o que dificulta o análise dos espectros. Esta técnica é de grande utilidade na determinação de estruturas moleculares de frações puras, no entanto sua interpretação e uso são limitados nas análises de amostras complexas como os extratos.

4.4 Avaliação da atividade biológica dos extratos

4.4.1 Testes de atividade antibacteriana

No teste feito com bactéria *Bacillus subtilis*, só o extrato (2 mg/mL) do cultivo do fungo controle *A. terreus* gerou halos de inibição do crescimento da bactéria (Figura 6), com um diâmetro médio de 6 mm, descontando o diâmetro (5 mm) do disco de papel filtro. Os controles com o acetonitrila 100% e com o extrato de farelo de trigo, não apresentaram halos de inibição do crescimento, confirmando assim que o efeito de inibição do crescimento da bactéria foi gerado por o extrato do cultivo fungo *A. terreus*.

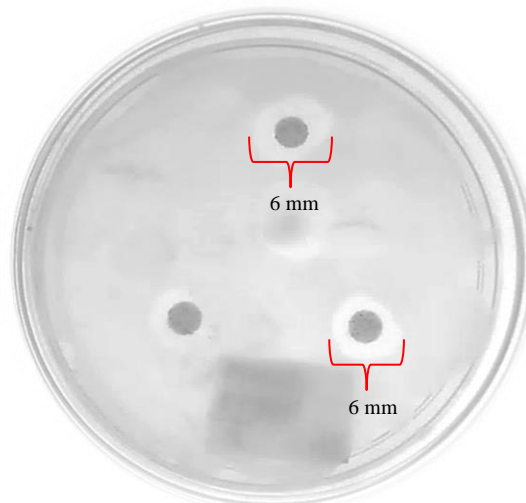


Figura 6- Halos de inibição do crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* tratada 10 μ L do extrato (2 mg/mL) do cultivo do fungo *A. terreus*. Imagem capturada após 8 horas de cultivo.

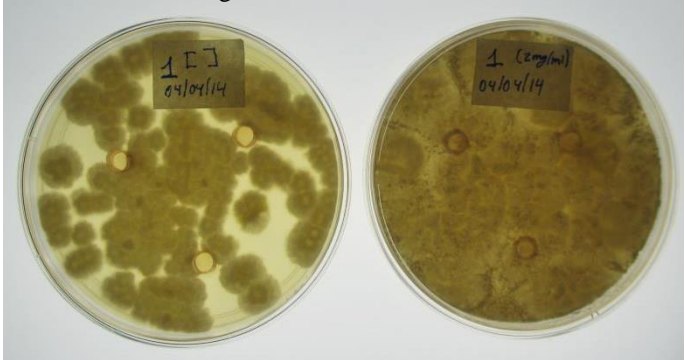
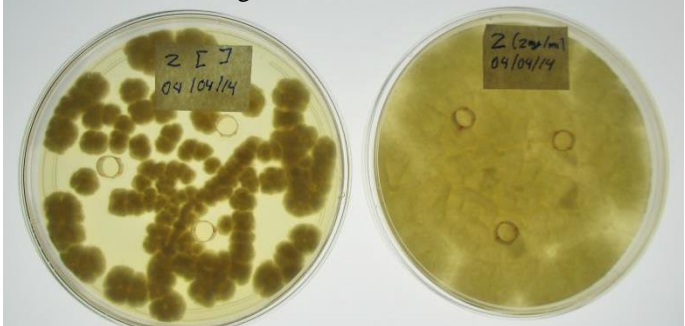
No caso do teste feito com a bactéria *E. coli*, foi observado que os extratos fúngicos, o controle com acetonitrila 100%, e o controle com extrato de farelo de trigo, não apresentaram efeito inibitório do crescimento da bactéria (imagens não apresentadas).

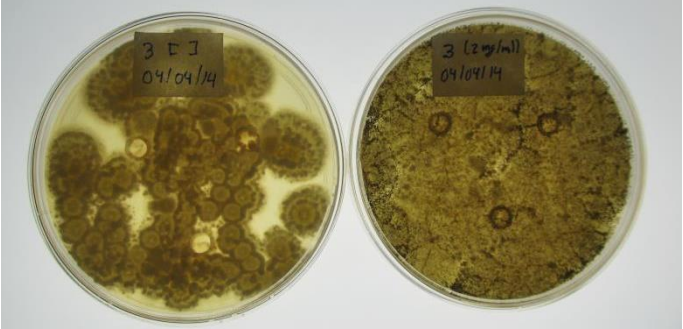
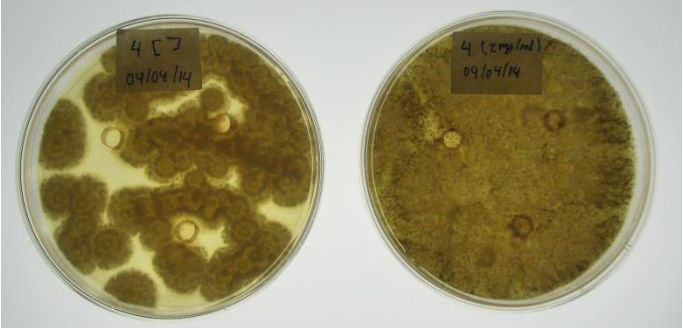
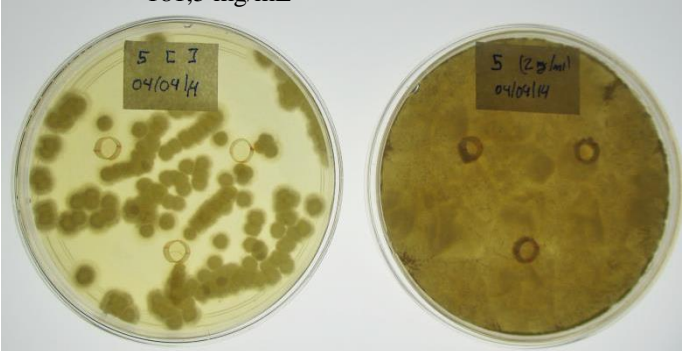
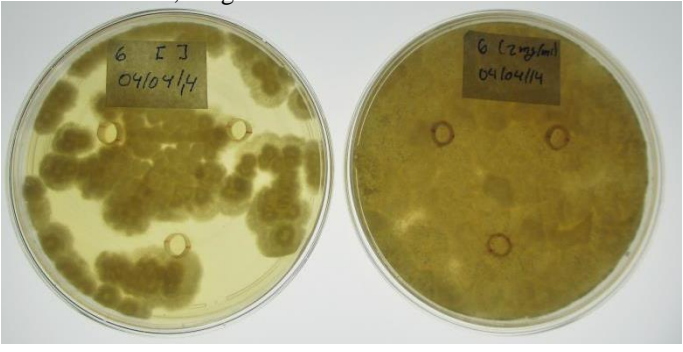
4.4.2 Teste atividade antifúngica sobre *Mucor* sp.

Neste ensaio, o fungo *Mucor* sp. foi utilizado como modelo considerando que segundo Roze e Linz (1998), a Lovastatina desencadeia (indiretamente) neste fungo, um processo de morte celular caracterizada pelo encolhimento celular, condensação, vacuolização do citoplasma, condensação da cromatina e fragmentação do DNA nuclear. Estas características assemelham-se a algumas das características conhecidas da apoptose em células de mamífero

e outro eucariotos. A causa desta ativação da morte celular programada é pela inibição indireta da produção de farnesil difosfato, precursor da produção de colesterol em seres humanos, ou ergosterol em plantas e microrganismos eucarióticos (MACREADIE et al., 2006), que posteriormente impede a prenilação de proteínas como a MRas1, importantes para o desenvolvimento morfológico do fungo (ROZE et al., 1999).

A partir dos resultados do ensaio apresentados na Tabela 1, foi possível observar que aos 7 dias de cultivo o tratamento dos conídios com os extratos fúngicos (2 mg/mL) não gerou um efeito inibitório do crescimento. No entanto quando foram avaliadas as concentrações iniciais dos extratos, foi observado que os conídios do fungo *Mucor* sp. germinaram, mas o crescimento radial de cada colônia foi limitado e a superfície do ágar não foi totalmente colonizada. Isto também foi observado na placa controle do experimento com os conídios tratados com o acetonitrila 100%. Assim, foi determinado que a limitação do crescimento não foi gerada pelos extratos e sim pelo acetonitrila.

CULTIVO	Extrato bruto	Concentração padronizada 2,0 mg/mL
<i>A. terreus</i>	<p style="text-align: center;">177,5 mg/mL</p> 	
<i>Saccharicola</i> sp.	<p style="text-align: center;">120,5 mg/mL</p> 	

<p><i>Fusarium</i> sp.</p>	<p>44,75 mg/mL</p> 
<p><i>Trichoderma</i> sp.</p>	<p>43,35 mg/mL</p> 
<p><i>A. flavus</i></p>	<p>181,5 mg/mL</p> 
<p><i>P. pinophilum</i></p>	<p>90,5 mg/mL</p> 

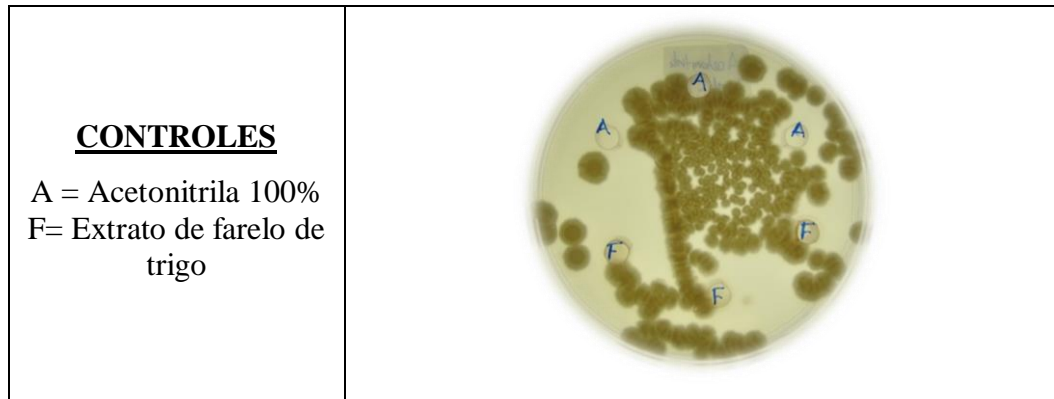


Tabela 1- Imagens dos cultivos (7 dias) dos conídios de *Mucor* sp. tratados com os extratos fúngicos, utilizando as concentrações iniciais de cada extrato (Extrato bruto) e uma concentração padronizada de 2,0 mg/mL.

4.4.3 Teste de atividade antifúngica sobre *Candida albicans*

A levedura *Candida albicans* é o principal agente gerador de candidíase sistêmica (KANEKO et al., 2013), é a quarta causa mais comum de infecção da corrente sanguínea (Candidemia) em pacientes hospitalizados, como pacientes com queimaduras, oncológicos neutropênicos, recém-nascidos prematuros e pacientes em recuperação de cirurgia cardíaca ou cirurgia abdominal (LIU et al., 2009). Atualmente, a incidência de infecções causadas por fungos oportunistas está aumentando, assim como o aumento na resistência a vários dos medicamentos utilizados no tratamento, o que gera uma grande necessidade de focar estudos para o desenvolvimento de novos fármacos e opções terapêuticas alternativas (CABRAL, FIGUEROA e FARIÑA, 2013).

Dos seis extratos fúngicos avaliados em *Candida albicans*, só o extrato (2 mg/mL) do cultivo de *A. terreus* apresentou atividade inibitória do crescimento da levedura. No entanto a inibição gerada pelo extrato foi parcial, considerando que só até as 48 horas de cultivo foi observada uma leve turbidez no poço da placa com as leveduras tratadas com o extrato do fungo mencionado. O efeito observado poderia estar relacionado com a possível produção de Lovastatina do fungo, já que segundo Gyetvai et al. (2006) este tipo de estatina gera um efeito fungistático em *C. albicans*, alterando de forma negativa a fluidez da membrana como resultado de modificações adaptativas na composição de ácidos graxos, fosfolipídeos e acúmulo de intermediários biossintéticos como o ergosterol. Vale ressaltar que os controles com leveduras tratadas com acetonitrila 100% e com o extrato de farelo de trigo (2 mg/mL) não apresentaram atividade inibitória do crescimento.

4.4.4 Teste de atividade antiparasitária sobre *Leishmania amazonensis*

Parasitas do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose, uma doença amplamente distribuída com uma prevalência de 12 a 14 milhões de pessoas e uma população de risco de 350 milhões de pessoas em 88 países diferentes (DESJEUX, 2004). Estima-se que anualmente ocorrem 1,3 milhão de novos casos, e de 20000 a 30000 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). O tratamento da leishmaniose depende de vários fatores como a forma clínica da doença, espécies de parasitas e localização geográfica; usualmente são administrados compostos antimoniais altamente tóxicos e pouco tolerados (ARRUDA et al., 2005). A terapia com antimônio penta valente é comumente associada com altos índices de não conformidade, e a resistência do parasita a estas moléculas aumenta de forma alarmante (ARRUDA et al., 2009). É por isso que os extratos produzidos neste estudo foram testados contra os parasitas em colaboração com o Laboratório de Leishmanioses do ICB/USP coordenado pela Professora Doutora Silvia Reni, contribuindo assim na busca de compostos que possam ser alternativas terapêuticas.

Os resultados obtidos (Figura 7) apresentaram que os extratos (2 mg/mL) dos cultivos dos fungos *A. terreus*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.*, e *Penicillium Pinophilum*, geraram as menores porcentagens de sobrevivência das formas promastigotas dos parasitas com valores de: 1%, 3%, 2% e 3% respectivamente.

É importante ressaltar que o extrato de farelo trigo também teve um efeito sobre viabilidade dos parasitas, gerando uma porcentagem de sobrevivência dos parasitas de 45%. Isto quer dizer que o resultado obtido com os extratos fúngicos poderia ser a resposta do um efeito sinérgico entre os compostos dos extratos fúngicos e os compostos do farelo de trigo. No caso do controle com acetonitrila, foi observado que o solvente não apresentou efeito sobre a proliferação dos parasitas.

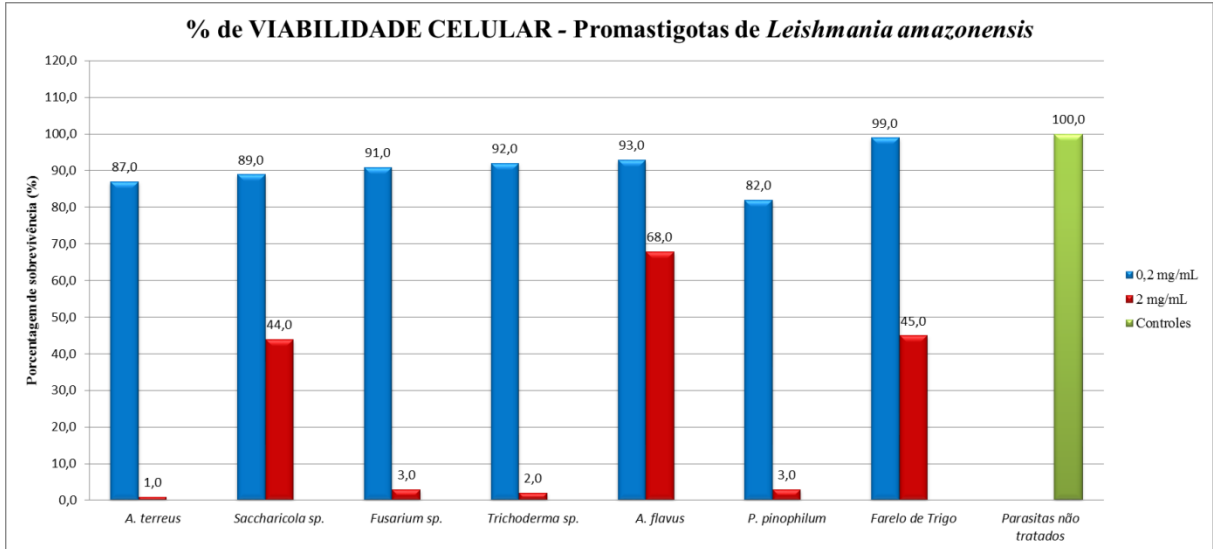


Figura 7- Viabilidade celular dos cultivos de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratados com concentrações de 0.2 mg/mL (Azul) e 2.0 mg/mL (vermelho) dos extratos fúngicos e do extrato de farelo de trigo. Em verde, o controle com os parasitas não tratados.

Adicionalmente, foram feitas observações no microscópio ótico (Tabela 2) dos poços com os parasitas tratados com o extrato do fungo *A. terreus*, e evidenciou-se que a concentração de 2 mg/mL gera um efeito de lises sobre os parasitas; com concentrações menores a 2 mg/mL observou-se uma diminuição do número de parasitas, mas sem alterações na morfologia.

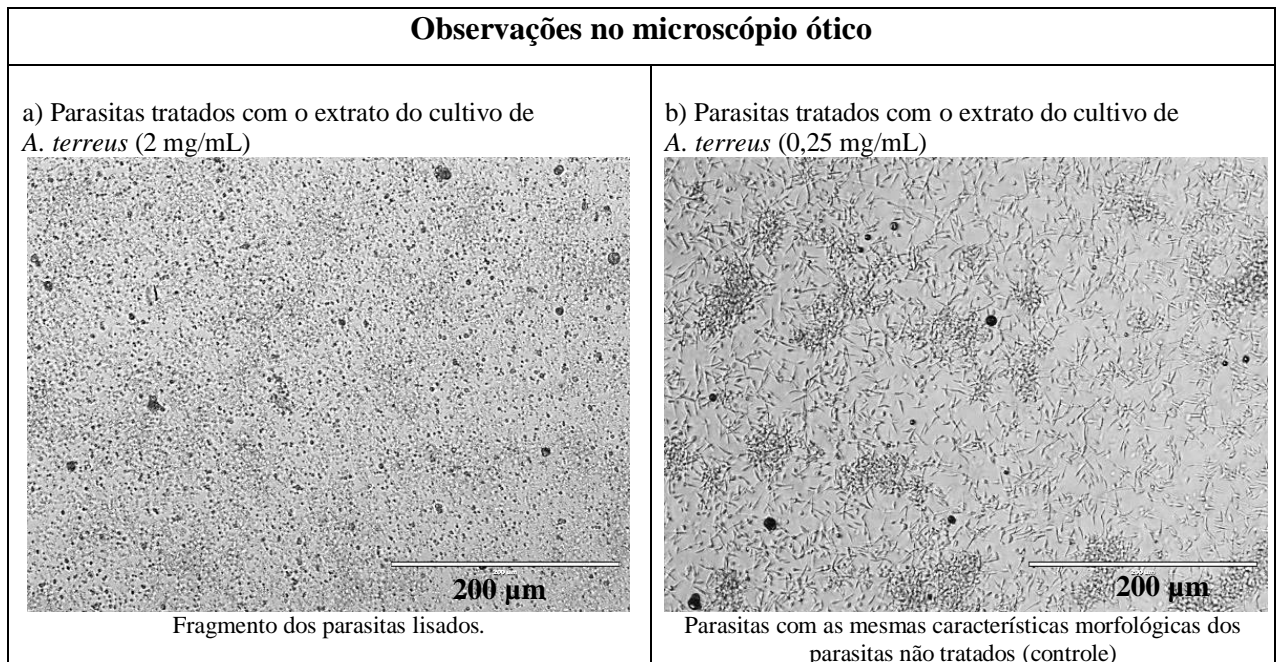


Tabela 2- Imagens microscópicas (20X) das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com o extrato do cultivo do fungo *A. terreus*. Na figura a) os parasitas tratados com o extrato (2 mg/mL) foram lisados. Na figura b) o extrato (0,25 mg/mL) foi observado uma diminuição da quantidade de parasitas em comparação ao controle de parasitas não tratados. Não foram observadas alterações na morfologia ou na motilidade dos parasitas.

4.4.5 Testes de atividade antiparasitária com *Trypanosoma cruzi* - FASE I

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, que no mundo todo afeta entre 7 e 8 milhões de pessoas, a maioria habitantes de Latinoamérica onde a doença é endêmica, (WHO, 2014). O parasita tem um ciclo de vida complexo que alterna entre um inseto vetor e hospedeiros mamíferos (os seres humanos entre eles) e a evolução clínica da doença em seres humanos pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. Até 30% das pessoas cronicamente infectadas desenvolvem alterações cardíacas, e até 10% desenvolvem alterações digestivas, neurológicas ou mistas que podem exigir tratamento específico. Nos anos posteriores, a infecção pode levar à morte súbita ou insuficiência cardíaca causada pela destruição progressiva do músculo cardíaco (DAMASCENO et al., 2014). O tratamento da doença depende de dois medicamentos que foram descobertos cerca de 40 anos atrás, o nifurtimox e o benzonidazol. Ambas as drogas são eficazes para o tratamento da fase aguda da doença. No entanto, sua eficácia diminui no tratamento da fase crônica, quando a maioria dos pacientes é diagnosticada. Além disso, desvantagens para ambas as drogas têm sido relatadas, como graves efeitos colaterais e mais recentemente, o surgimento de parasitas resistentes ao medicamento (BOSCARDIN et al., 2010). Como exemplo, só na Colômbia o custo anual dos cuidados médicos para todos os pacientes com a doença foi estimado em cerca de 267 milhões dólares em 2008 (WHO, 2014). Esses fatos reforçam a necessidade urgente de intensificar a busca de novas drogas contra *T. cruzi* (URBINA, 2010), o que é principal motivo da avaliação do efeito dos extratos produzidos neste estudo sobre *T. cruzi*. Os testes desta etapa foram feitos em colaboração com o Laboratório “Unit for Drug Discovery” do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, coordenado pelo Professor Doutor Ariel Silber.

Os resultados obtidos nos ensaios de proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas como os extratos fúngicos e com o extrato de farelo de trigo são apresentados na Tabela 3. Segundo o perfil dos gráficos, concentrações dos extratos fúngicos acima de 2 mg/mL interferem com a leitura inicial da concentração de parasitas, isto é, pela reação entre o meio de cultura e os extratos, gerando assim um precipitado. Além disso, outro aspecto que compartilham todos os gráficos é que com concentrações de 2 mg/mL dos extratos fungicos é obtido o mesmo perfil que o controle positivo de inibição da proliferação. Observações no microscópio ótico (imagens não mostradas), indicaram que os parasitas tratados com concentrações de 2 mg/mL ou superiores dos extratos fúngicos, os parasitas são lisados. Nas figuras 8c; 8d e 8f, foi observado que os cultivos tratados com os extratos a concentrações de

1 mg/mL e 2 mg/mL, apresentaram o mesmo perfil que o controle positivo de inibição, no entanto, segundo as observações no microscópio (imagens não apresentadas), os parasitas tratados com as concentrações de 1 mg/mL não foram lisados, mas a sua morfologia foi modificada, virando de uma forma alargada e móbil, a uma forma arredondada e imóvel, incapaz de proliferar.

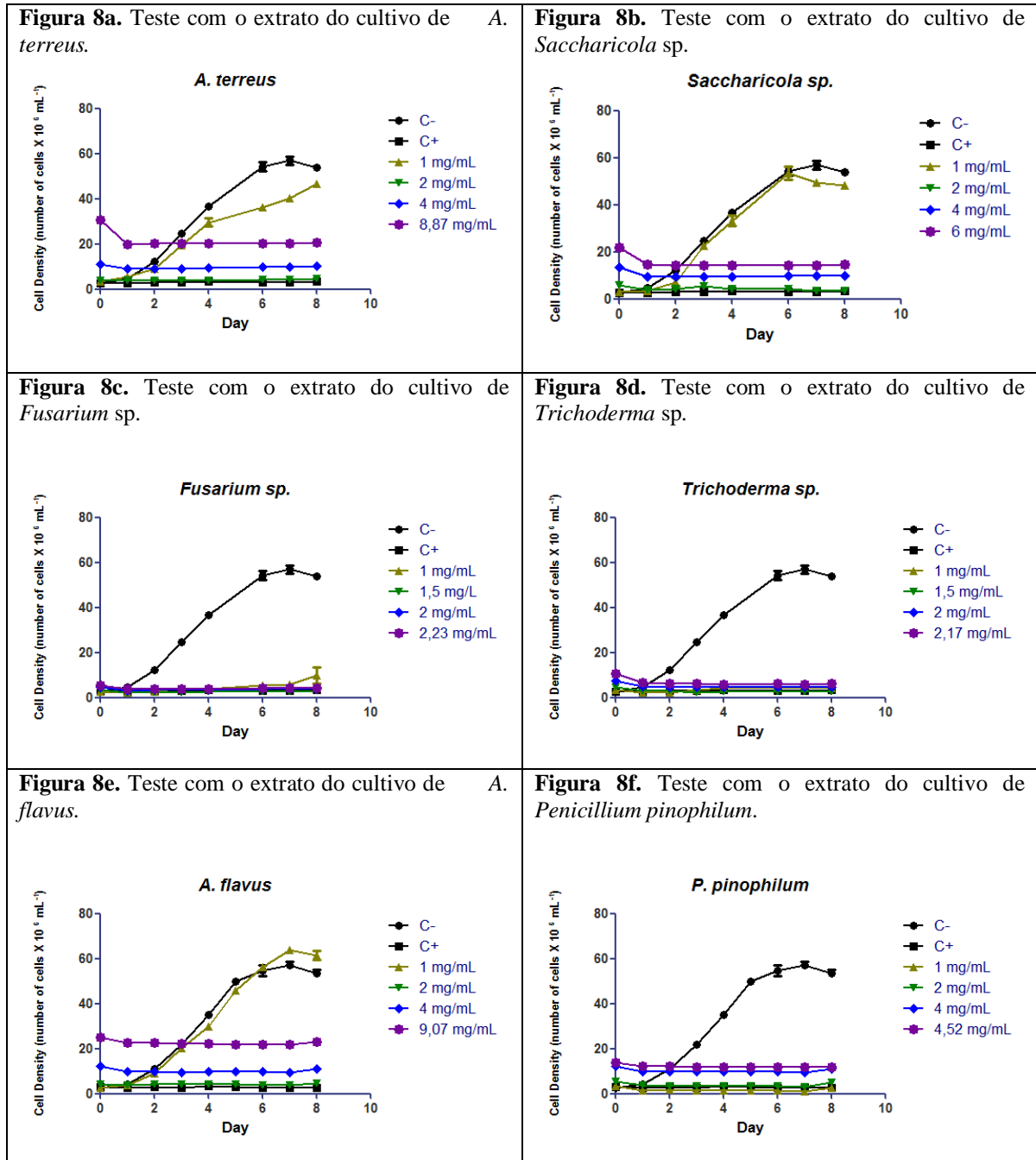
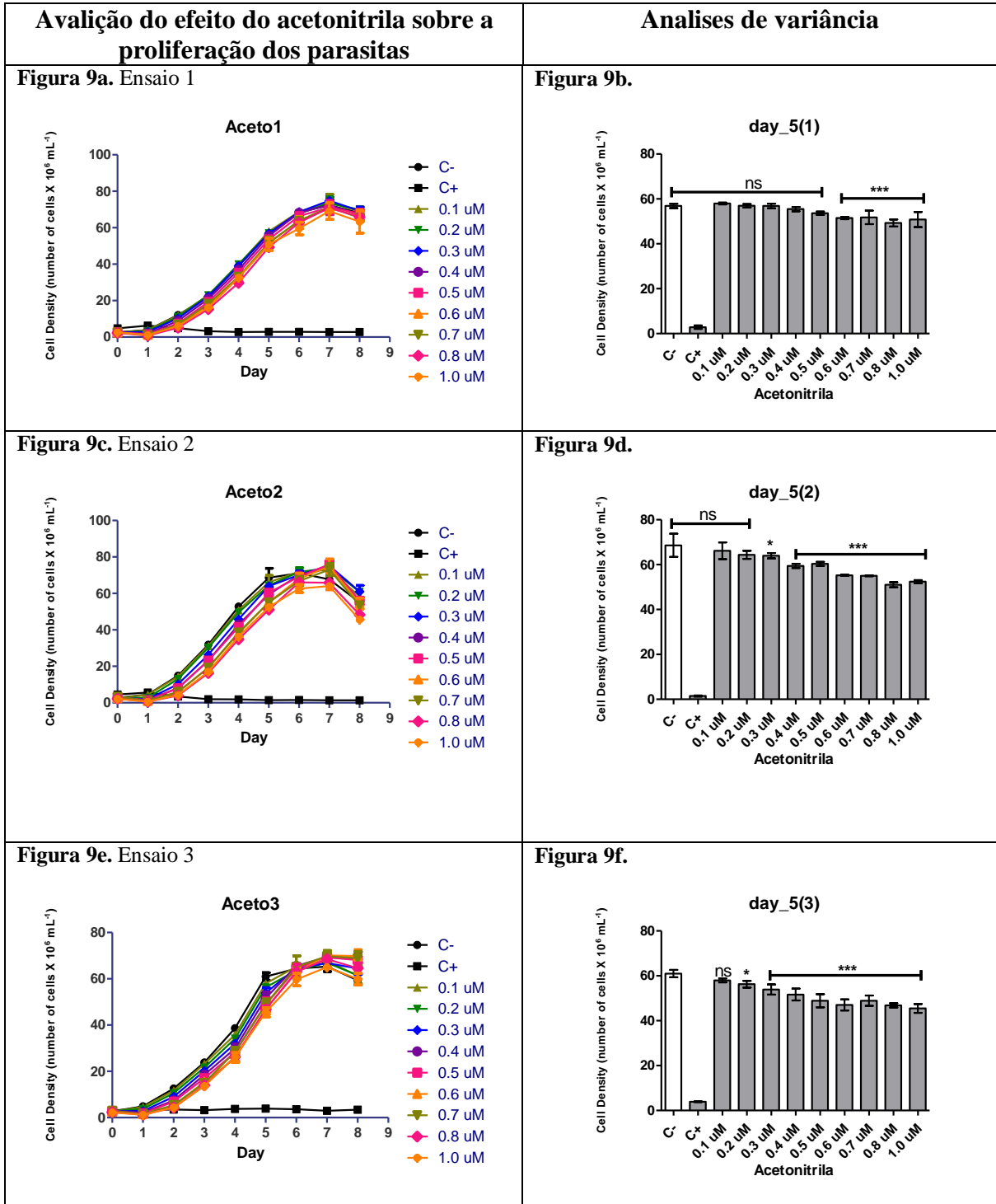


Tabela 3- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações dos extratos fúngicos sobre a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. No controle positivo da inibição de proliferação dos parasitas (C+) foi utilizada uma solução de Rotenona (60 μM) e Antymicina (0.5 μM). Como controle negativo de inibição (C-) foram utilizados parasitas não tratados.

Como controle, foram feitos testes para determinar o efeito de diferentes concentrações de acetonitrila sobre a proliferação dos parasitas (Figuras 9a; 9c; 9e; 9g; 9i; 9k), determinado assim a concentração máxima do solvente que poderia ser utilizada sem interferir significativamente sobre a proliferação do parasita.



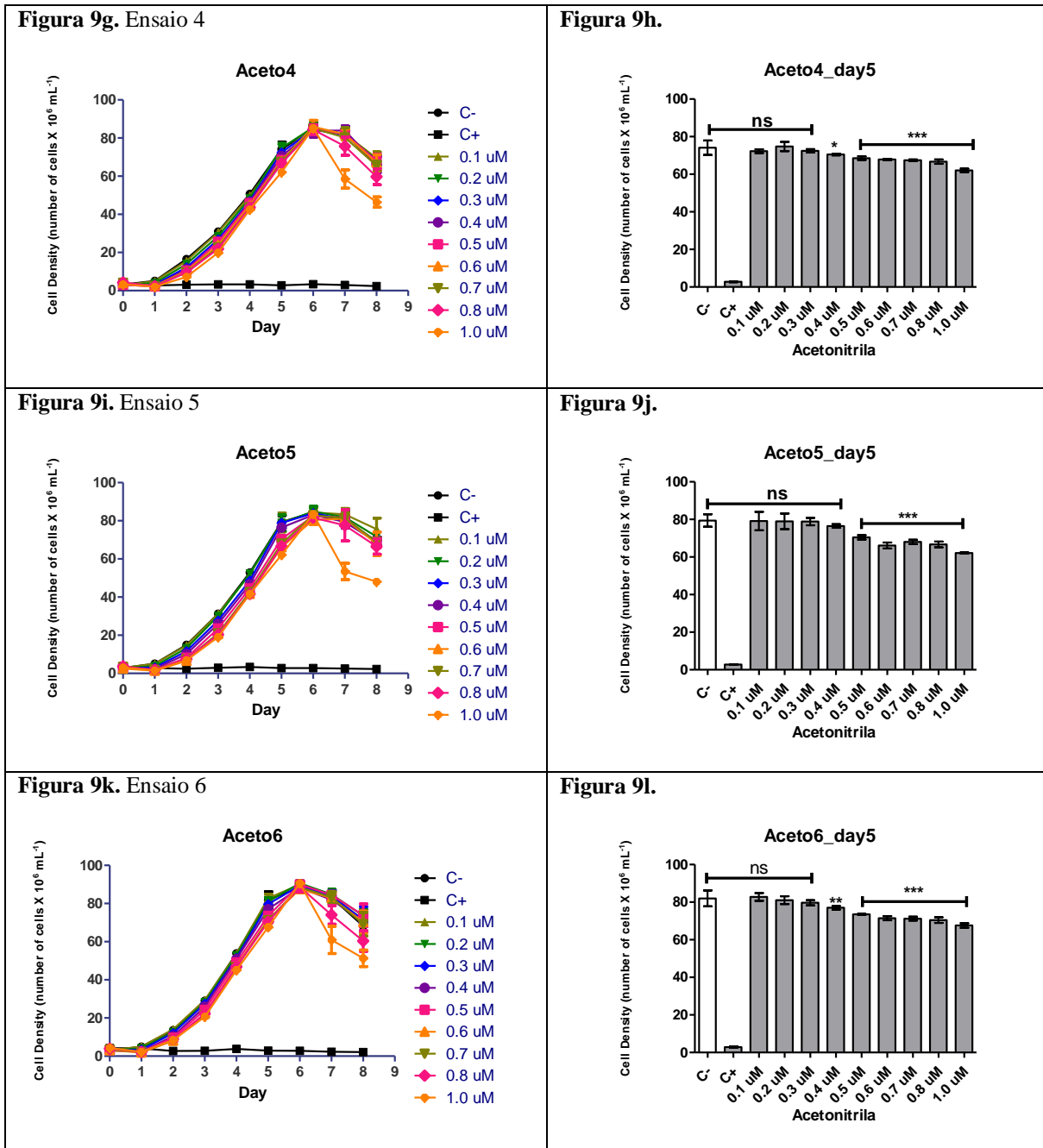


Tabela 4- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações de acetoneitrila (0,1 μ M – 1,0 μ M) sobre a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figuras 9a; 9c; 9e; 9g; 9i; 9k) cultivados durante 8 dias. No controle positivo da inibição da proliferação dos parasitas (C+) foi utilizada uma solução de Rotenona (60 μ M) e Antimicina (0,5 μ M). Como controle negativo de inibição (C-) foram utilizados parasitas não tratados. Análises de variância quando $p < 0,05$ (Figuras 9b; 9d; 9f; 9h; 9j; 9l) do efeito das concentrações do solvente sobre a proliferação dos parasitas: (ns) Efeito não significativo; (**) Efeito medianamente significativo; (***) Efeito significativo.

Segundo a análise de variância (Figuras 9b; 9d; 9f; 9h; 9j; 9l), foi determinado que utilizando concentrações menores a 0,3 μ M de acetoneitrila, o solvente não interfere de forma significativa (quando $p < 0,05$) na proliferação do parasita. Por tanto é descartado que o solvente seja o responsável dos resultados obtidos na avaliação dos extratos em concentrações

menores o iguais a 2 mg/mL, já que para preparar estas concentrações foram utilizados menos de 0,3 μ M de acetoneitrila.

Na avaliação do efeito extrato de farelo de trigo sobre a proliferação dos parasitas (Figura 10), foi observado que em concentrações de 1,34 mg/mL, a densidade celular obtida tem o mesmo perfil que o controle de positivo de inibição (C+). Este resultado é grande importância, considerando que parte da composição dos extratos fúngicos é extrato de farelo de trigo, o que poderia ser a causa das similitudes dos resultados obtidos na avaliação dos extratos sobre a proliferação dos parasitas.

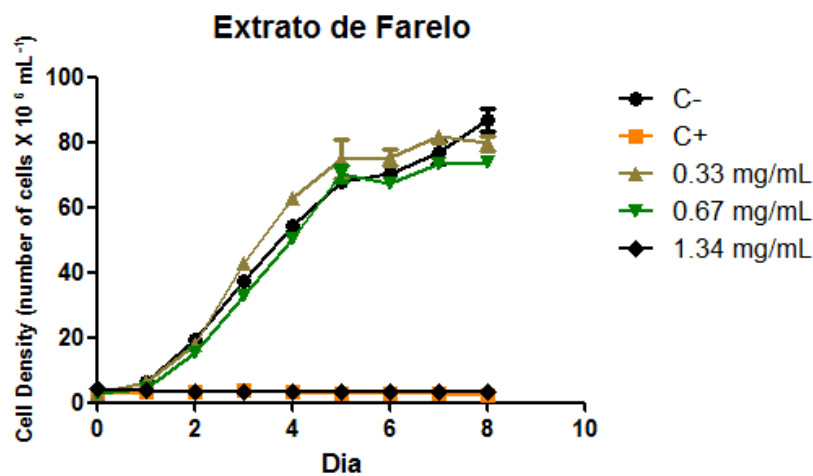


Figura 10- Avaliação da atividade de diferentes concentrações do extrato de farelo de trigo sobre a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas durante 8 dias. No controle positivo da inibição da proliferação dos parasitas (C+) foi utilizada uma solução de Rotenona (60 μ M) e Antymicina (0.5 μ M). Como controle negativo de inibição (C-) foram utilizados parasitas não tratados.

4.4.6 Testes de citotoxicidade com células de Ovários de Hamster Chinês (CHO)

O objetivo principal do experimento foi avaliar o efeito dos extratos e do acetoneitrila sobre a viabilidade das células de mamífero, considerando que uma das etapas ciclo biológico dos parasitas avaliados neste estudo (*T. cruzi* e *Leishmania amazonenses*) é intracelular, o que é um alvo adicional na busca de tratamentos. Nos ensaios dos tratamentos das células CHO com os extratos fúngicos (2 mg/mL) e com o extrato de farelo de trigo (1,34 mg/mL), os valores obtidos da viabilidade celular foram próximos ao zero (Figuras 11a e 11b), o que dizer que nas concentrações avaliadas os extratos são altamente tóxicos. É por isso que foi feito outro teste tratando as células com a metade da concentração dos extratos, obtendo como resultado (Figura 11c) um incremento nos valores da viabilidade celular das células tratadas

com os extratos dos cultivos de *Saccharicola* sp., *Trichoderma* sp., *A. flavus*, e do extrato de farelo de trigo, no entanto estes valores ainda não atingem os valores de viabilidade do controle de células não tratadas.

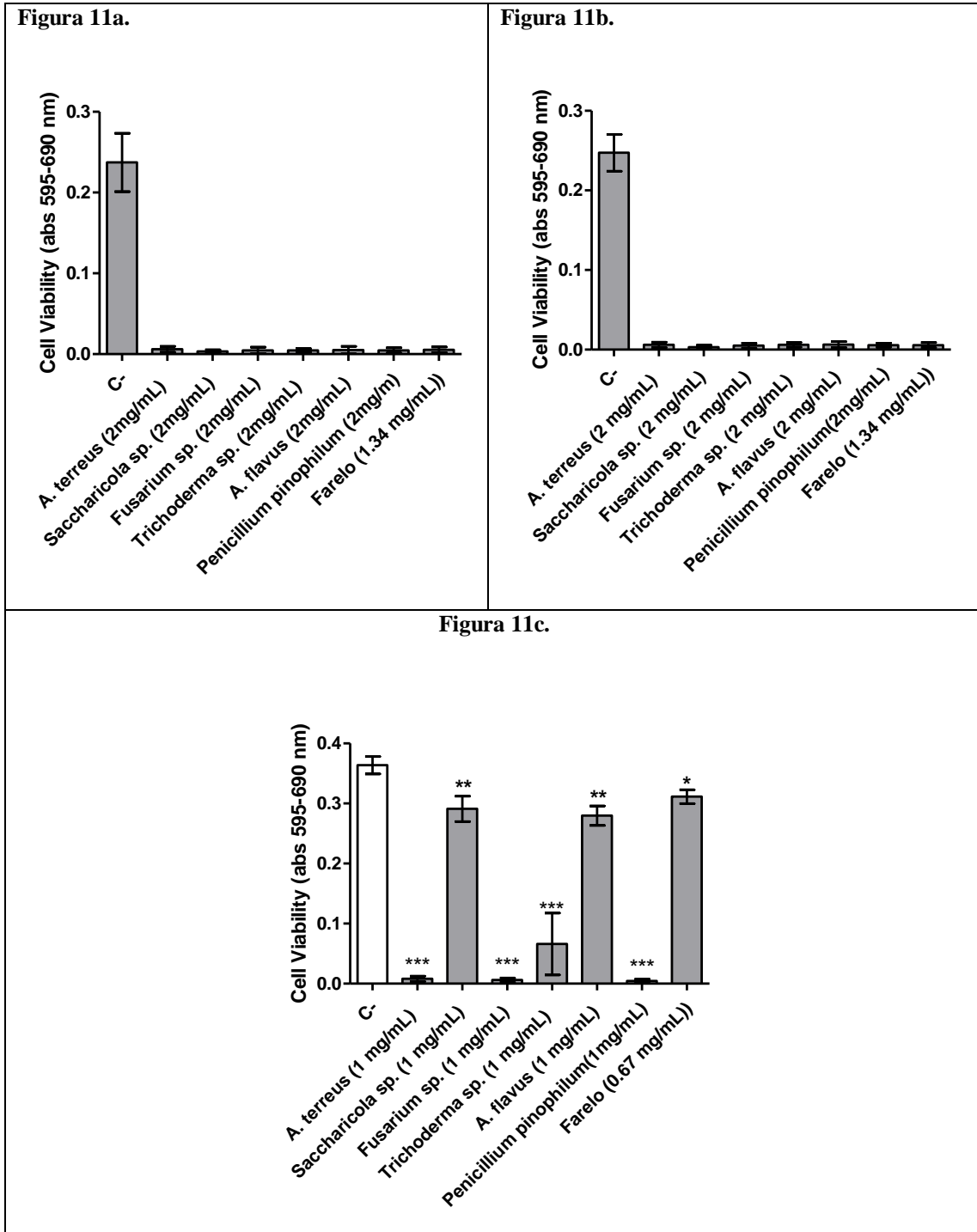


Tabela 5- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações dos extratos fúngicos e do extrato de farelo e trigo sobre a viabilidade das células CHO. Como controle negativo (C-) foram utilizadas células não tratadas. Análises de variância quando $p < 0,05$: (*) Efeito pouco significativo do extrato sobre a viabilidade celular; (**) Efeito medianamente significativo; (***) Efeito significativo sobre a viabilidade celular.

A partir da placa com os cultivos celulares tratados com a metade da concentração dos extratos, foram feitas observações com o microscópio ótico para determinar o efeito dos extratos sobre a morfologia das células (Tabela 6). Nas Figuras 12c, 12e e 12h é possível observar que as células não estão aderidas e espalhadas na superfície da placa, o que sim acontece no controle com as células não tratadas (Figura 12a) e com as células tratadas com o extrato de farelo de trigo (Figura 12b). Em relação aos extratos fúngicos, cada extrato apresentou um efeito de dano celular diferente nas células CHO, caso do extrato do cultivo de *Saccharicola* sp. que gerou grumos e alterações na morfologia celular (Figura 12d); células arredondadas com o extrato do cultivo *A. terreus* (Figura 12c.) e células alargadas com partículas no interior com o extrato do cultivo de *Trichoderma* sp. (Figura 12f.).

Figura 12a- Controle – Células não tratadas.

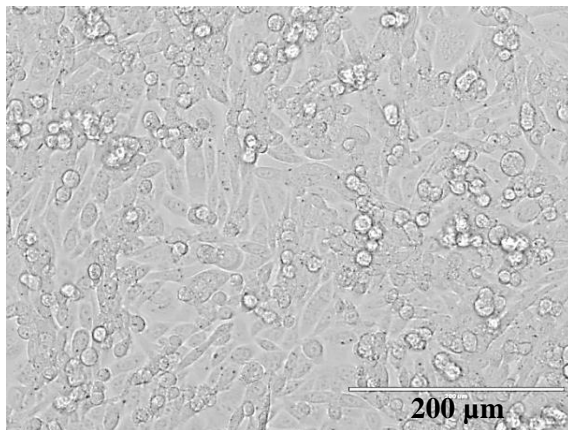


Figura 12b- Células tratadas com o extrato de farelo de trigo (0.67 mg/mL).

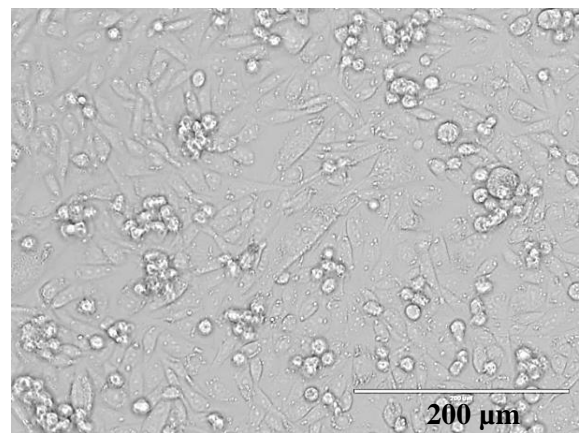


Figura 12c- Células tratadas com o extrato do cultivo de *A. terreus* (1mg/mL).

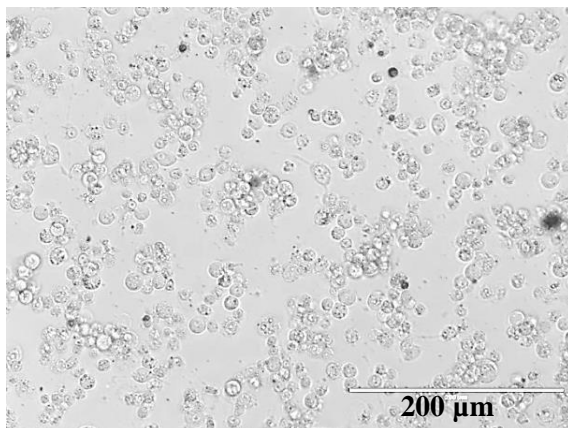


Figura 12d- Células tratadas com o extrato do cultivo de *Saccharicola* sp. (1mg/mL).

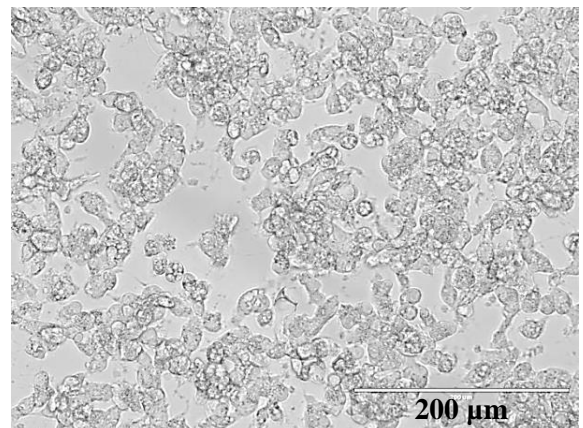


Figura 12e- Células tratadas com o extrato do cultivo de *Fusarium* sp. (1mg/mL).

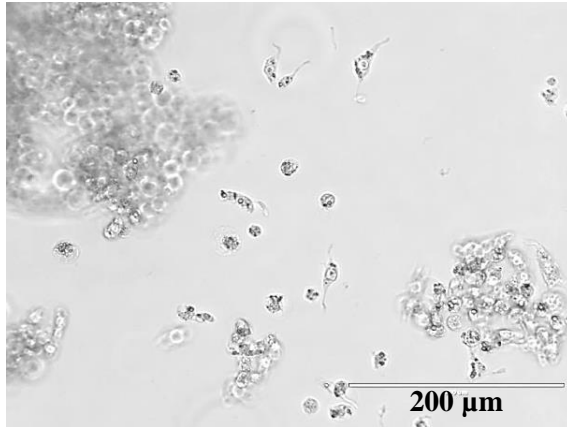


Figura 12f- Células tratadas com o extrato do cultivo de *Trichoderma* sp. (1mg/mL).

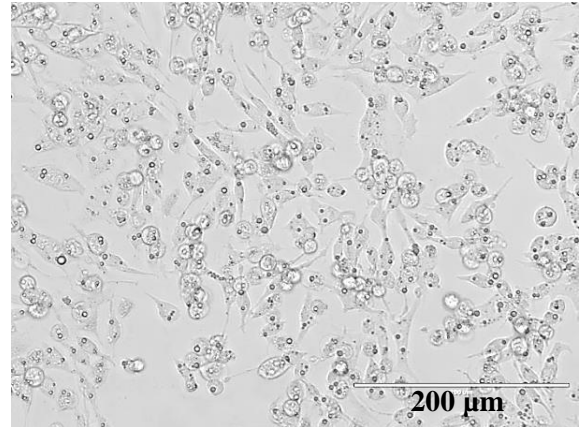


Figura 12g- Células tratadas com extrato do cultivo de *A. flavus* (1mg/mL).

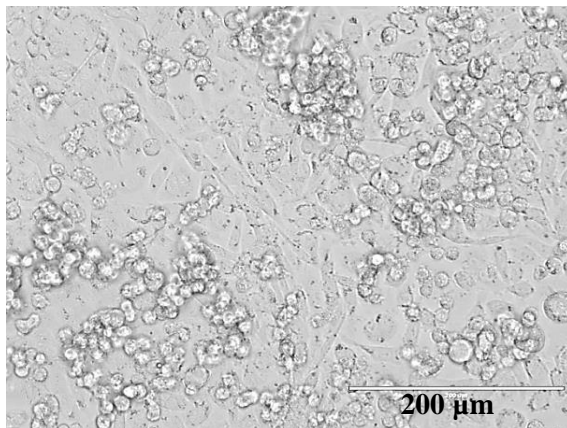


Figura 12h- Células tratadas com o extrato do cultivo de *P. pinophilum*.

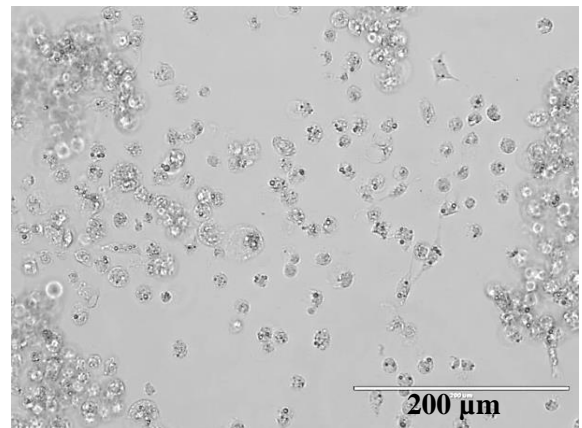


Tabela 6- Imagens de microscópio ótico (20X) das células CHO tratadas com os extratos fúngicos (12c; 12d; 12e; 12f; 12g; 12h) (1 mg/mL) e com extrato de farelo de trigo (12b). Controle com células não tratadas (12a.)

Na avaliação do efeito do acetonitrila (0,1 – 1,9 μM) sobre a viabilidade celular (Tabela 7), foi determinado que concentrações do solvente menores a 0,8 μM não tem um efeito significativo (quando $p < 0,05$) na viabilidade das células. Esta concentração é superior às concentrações utilizadas na preparação dos extratos fúngicos (2 mg/mL) e do extrato farelo de trigo (1,34 mg/mL).

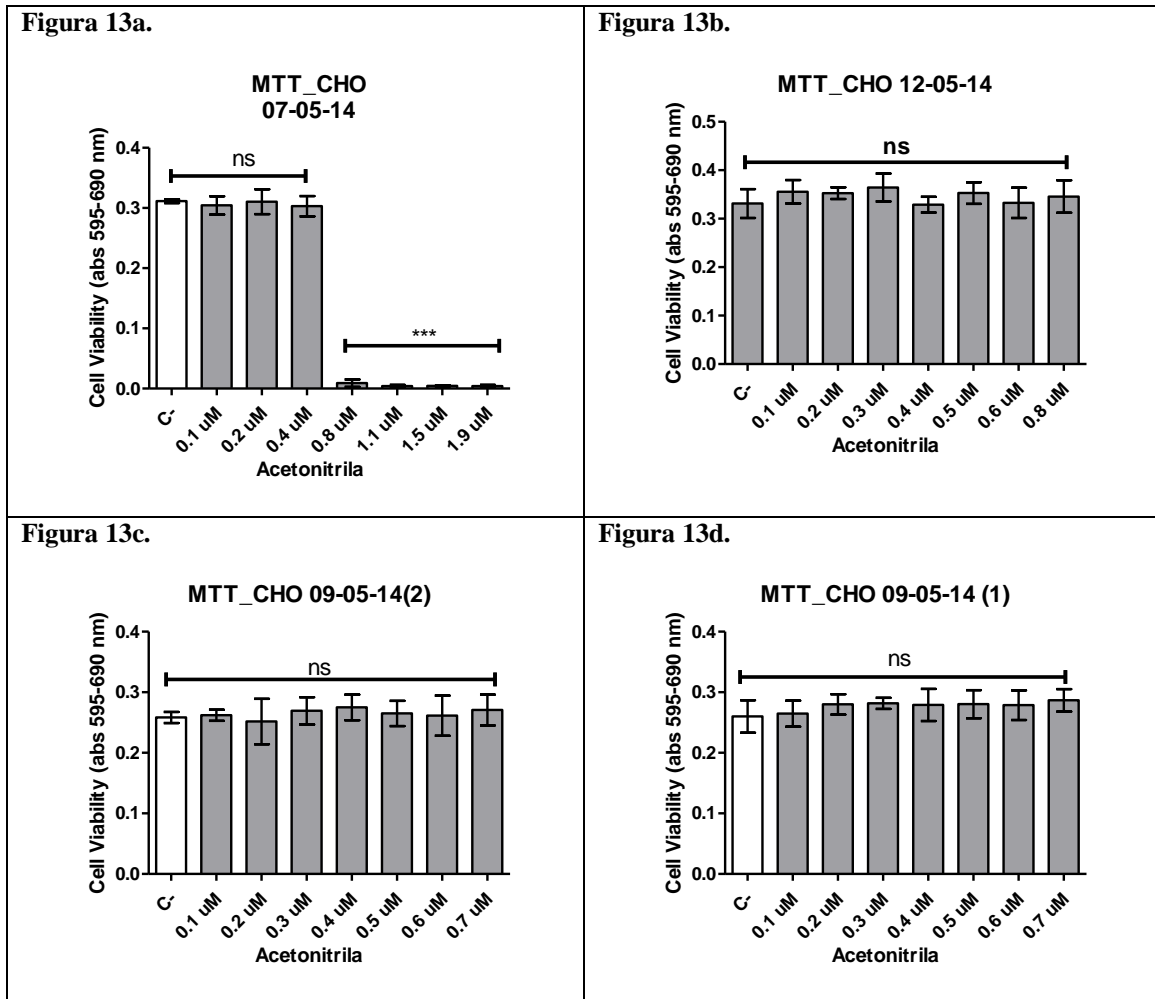


Tabela 7- Figuras da avaliação da atividade de diferentes concentrações de acetonitrila (0,1 – 1,9 μ M) sobre a viabilidade celular de células CHO (Figuras 13a; 13b; 13c; 13d). Análises de variância quando $p < 0,05$, (ns) = Efeito não significativo sobre a viabilidade celular das células tratadas com as diferentes concentrações do acetonitrila.

4.4.7 Testes de atividade antiparasitária com *Trypanosoma cruzi* - FASE II

Os resultados dos ensaios da FASE I apresentaram uma atividade biológica dos extratos contra *T. cruzi*. No entanto nos ensaios foram utilizadas formas epimastigotas dos parasitas, e segundo o ciclo de vida do parasita (BERN, 2015), este tipo de formas encontra-se no vector e não no hospedeiro onde é gerada a doença; adicionalmente, as concentrações dos extratos utilizadas nos tratamentos foram relativamente altas, além que os resultados não são compráveis com outros estudos. É por isto que nesta etapa foram avaliadas formas tripomastigotas do parasita, assim como diferentes concentrações dos extratos (300 μ g/mL – 2,3 μ g/mL) dos cultivos de *Trichoderma sp.* e *Penicillium pinophilum*, e o extrato de farelo de trigo, para assim determinar os valores do IC₅₀ (Tabela 8). Os experimentos foram feitos

no Laboratório de Toxicologia Aplicada do Instituto Adolfo Lutz, coordenado pelo Professor Doutor André Tempone.

AMOSTRAS	IC ₅₀ (µg/mL) CI 95% Tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>
Extrato de Farelo de trigo (Fração 1)	11,26 (7,71 – 16,43)
Extrato do cultivo de <i>Trichoderma</i> sp. (Fração 3)	10,69 (8,78 – 13,02)
Extrato do cultivo de <i>Penicillium pinophilum</i> (Fração 5)	20,47 (7,34 – 57,04)
Benzonidazole*	139,00 (118,80 – 162,74)

Tabela 8- Valores da concentração inibitória de 50 % dos parasitas (tripomastigotas de *T. cruzi*) tratados como as frações do extrato de farelo de trigo, e dos cultivos dos *Trichoderma* sp. e *Penicillium pinophilum* com concentrações entre 300 µg/mL e 2,35 µg/mL; Como controle positivo de inibição foi usada a droga padrão Benzonidazole; CI95%: 95% de intervalo de confiança);* (SANTOS et al., 2015).

Partindo dos valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios de formas tripomastigostas tratadas com o extrato de farelo de trigo (IC₅₀= 11.26) e com os extratos fúngicos de *Trichoderma* sp. (IC₅₀=10.69) e *Penicillium pinophilum* (IC₅₀= 20.47), destaca-se a diferença com o valor obtido com o fármaco padrão benzonidazol (IC₅₀= 139.00). Apesar de obter atividades promissárias é necessário isolar os compostos presentes nos extratos dado que a resposta obtida poderia ser a causa de um efeito sinérgico; adicionalmente é necessário determinar a sua concentração citotóxica (CC₅₀), para assim determinar o índice de seletividade. Na avaliação da viabilidade de um composto de interesse é necessário determinar a sua toxicidade a traves da relação entre os valores do IC₅₀ e da CC₅₀ (IC₅₀/CC₅₀), quanto menor a concentração do composto para causar a morte do parasita, mais eficaz ele é. Por outro lado, com as células de mamífero devem-se apresentar valores mais altos, pois quanto maior a concentração necessária para produzir a morte da célula saudável, maior é a resistência da célula frente ao composto. Deve-se ressaltar que o extrato de farelo de trigo apresentou atividade, o que foi uma constante nos ensaios feitos com os parasitas, e poderia ser inferido que ele é a causa da atividade obtida com os extratos fúngicos, considerando que parte da sua composição é farelo de trigo.

Segundo Prückler et al. (2014), anualmente são produzidas mais de 650 milhões de toneladas de trigo no mundo, sendo o farelo o seu principal subproduto, que desde o ponto de vista histológico, é composto de tecidos diferentes com distintas propriedades e composições,

incluindo componentes menores como flavonoides, lignanos e compostos fenólicos como ácidos fenólicos e alkylresorcinois (lipídios fenólicos), os quais apresentam atividades como antimicrobianos, anti-inflamatórios, antioxidantes e anticancerígenos (APPRICH et al., 2014).

Embora na literatura não seja reportado o efeito anti- *T. cruzi* a partir de compostos isolados do farelo de trigo, os estudos de Grecco et al. (2014) apresentaram uma atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi* gerada por derivados fenólicos isolados da planta *Baccharis uncinella* tratada com etanol, usada na medicina popular para o controle ou tratamento de várias doenças como malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias, amigdalite e infecções parasitárias (FABIANE et al., 2008).

O farelo de trigo contém entre 3,5 e 3,9% de graxas (APPRICH et al., 2014), e dentro dos ácidos graxos insaturados os mais abundantes são o ácido linoleico e o ácido oleico com 57% e 15% respectivamente; dentre os ácidos graxos saturados presentes o ácido palmítico é o mais abundante com 18% (EL-SHAMI et al., 2011; JUNG et al., 2010). O anterior é de grande importância considerando os resultados obtidos neste estudo, incluindo as características dos extratos e as análises de RMN, CCDS e CG/EM (Apêndice F), os quais indicaram a presença de ácidos graxos nas amostras, o que poderia estar diretamente relacionado com os resultados obtidos na avaliação da atividade biológica dos extratos com os parasitas, levando em conta as informações e os resultados obtidos no estudo de Cunningham, Kazan e Kuwahara (1972), no qual foi avaliado o efeito de diferentes ácidos graxos de cadeia longa como os ácidos Esteárico, Láurico, Linoleico, Behénico, Araquídico, Mirístico e Palmítico, sobre vários parasitas da família Trypanosomatidae, incluindo *T. cruzi* (nas formas epimastigota e tripomastigota) e duas espécies de *Leishmania*; obtendo como resultado que este tipo de compostos podem induzir a lisis dos parasitas flagelados tratados, assim como possíveis alterações na sua morfologia. Apesar de que vários ácidos graxos são fatores de crescimento em *T. cruzi*, pode-se esperar que o mecanismo para o transporte de ácidos graxos através da membrana seja relativamente específico, portanto ácidos graxos tóxicos para o parasita poderiam-se ligar em proteínas transportadoras e penetrar a membrana do organismo sem ser transportado no interior da célula, gerando assim instabilidade e perturbações na sua estrutura. A interrupção irá depender da natureza do ácido, a concentração, a estrutura da membrana e a capacidade do sistema de transporte de reconhecer os ácidos graxos (CUNNINGHAM, KAZAN E KUWAHARA, 1972).

4.5 Determinação da espécie da cepa *Trichoderma* sp. (CBMAI 1018)

Segundo as análises para identificar a espécie do fungo *Trichoderma* sp. (CBMAI 1018), realizadas no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Microbiologia do ICB/USP, coordenado pelo Professor Doutor Benedito Correa, foi determinado (com uma porcentagem de identidade de 99%) que a espécie do fungo é: *Trichoderma koningiopsis*.

Este fungo é considerado uma espécie comum, cosmopolita e essencialmente tropical (SAMUELS et al., 2006); e como endofítico segundo o estudo de Razinger et al. (2014), e com potencial como biocontrolador segundo Saxena, Raghuwanshi e Singh (2015).

Espécies de *Trichoderma* caracterizam-se pelo seu crescimento rápido, capacidade para degradar diversos substratos, promover o crescimento vegetal, pela sua capacidade de produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, enzimas (hemicelulase, celulase), resistência a produtos químicos nocivos, expressão de proteínas heterólogas e pelo uso como agentes de controle de nematódos e fungos patógenos de plantas (CARVAJAL, ORDUZ e BISSET et al., 2009; CORONA et al., 2008; LOPES et al., 2012; QUINTERO et al., 2013; SANTOS et al., 2012; SUN et al., 2012; XIA et al., 2011). Enquanto *Trichoderma* não é patogénico em mamíferos saudáveis, há um número crescente de indivíduos imunocomprometidos que sofrem de infecções oportunistas por algumas espécies, assim como a produção de reações alérgicas geradas por compostos voláteis (BŁASZCZYK et al., 2011).

Não foram encontradas publicações que indiquem que o fungo *Trichoderma koningiopsis* seja produtor de compostos antiparasitários, ou compostos do grupo das estatinas. No entanto a sua identificação vai contribuir no melhoramento da base de dados do CBMAI, assim como na possível geração de projetos baseando-se em suas características.

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos na avaliação da capacidade de produção de estatinas por os fungos filamentosos *Saccharicola* sp. (CBMAI 1030); *Fusarium* sp. (CBMAI 1015); *Trichoderma koningiopsis* (CBMAI 1018); *Aspergillus flavus* (CBMAI 1023) e *Penicillium pinophilum* (CBMAI 1022) mediante um cultivo em semi-sólido, determinou-se que nas condições de cultivo utilizadas neste estudo os fungos avaliados não produzem este tipo de moléculas.

Ao não ser possível separar a biomassa fúngica do substrato dos cultivos (farelo de trigo), não foi possível determinar se os compostos produzidos pelos fungos poderiam gerar um efeito antiparasitário. É por isso que sugere-se modificar as condições de cultivo dos fungos de tal forma que no momento da extração dos metabolitos o substrato utilizado não esteja presente. Isto também vai contribuir na etapa de purificação das frações de interesse. De igual forma, sugere-se modificar o sistema de solventes visando extrair um espectro maior de metabolitos, levando em conta que neste estudo só foi utilizado um único sistema de extração, focado na extração das moléculas alvo, as estatinas. É importante ressaltar que em estudos prévios, os extratos do grupo de fungos selecionados cultivados em meio líquido, apresentaram atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos.

Destacam-se os resultados obtidos nos testes de atividade antiparasitária do extrato de farelo de trigo, especialmente os resultados da atividade sobre as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, considerando que é o agente causal de uma doença negligenciada que precisa de novas alternativas para ser tratada, e o farelo de trigo apesar de ser um substrato amplamente estudado, não há estudos descrevendo o efeito obtido, portanto poderia ser um possível objeto de estudo na busca de compostos com atividade antiparasitária.

A pesar das dificuldades de trabalhar com produtos naturais, este tipo de produtos é de grande importância para a expansão da diversidade de compostos químicos, assim como a geração de produtos de alto impacto, lembrando que tem sido a principal fonte de moléculas para o desenvolvimento de drogas para diferentes usos terapêuticos. Esta variedade de compostos está diretamente relacionada com a biodiversidade, e o Brasil, país imensamente biodiverso, tem um grande potencial de bioprospecção.

REFERÊNCIAS*

- ALBERTS, A. Discovery, biochemistry and biology of Lovastatin. **The American Journal of Cardiology**, v. 62, p. 10J–15J, 1988.
- APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 222–231, 2014.
- ARRUDA, D.; D’ALEXANDRI, F.; KATZIN, A.; ULIANA, S. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679–1687, 2005.
- ARRUDA, D.; MIGUEL, D.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.; KATZIN, A.; ULIANA, SILVIA. Inhibitory activity of limonene against Leishmania parasites in vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 643–649, 2009.
- BAÑOS, J.; TOMASINI, A.; SZAKÁCS, G.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 105–110, 2009.
- BARRIOS-GONZALES, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175–185, 2012.
- BARRIOS-GONZALES, J.; MIRANDA, R. Biotechnological production and applications of statins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 869–883, 2010.
- BARRIOS-GONZALES, J.; MIRANDA, R. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 179–186, 2008.
- BERN, C. Chagas’ Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 456–466, 2015.
- BIZUKOJC, M.; PAWLAK, M.; BORUTA, T.; GONCIARZ, J. Effect of pH on biosynthesis of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 253–261, 2012.
- BŁASZCZYK, L.; POPIEL, D.; CHEŁKOWSKI, J.; KOCZYK, G.; SAMUELS, G.; SOBIERALSKI, K.; SIWULSKI, M. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, p. 233–243, 2011.
- BOSCARDIN, S.; TORRECILHAS, A.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E.; TONELLI, R.; SILBER, A. Chagas’ disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1373–1384, 2010.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CABRAL, M.; FIGUEROA, L.; FARÍÑA, J. Synergistic antifungal activity of statin–azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* bioassays and ergosterol quantification. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 1, p. 31–38, 2013.

CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSET, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 615–631, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard-Third Edition, M27-A3, 2008.

CORONA, L.; MENA, S.; RINCÓN, S.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A.; SHIRAI, K.; ZAPATA, A. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 167–177, 2008.

CUNNINGHAM, L.; KAZAN, B.; KUWAHARA, S. Effect of long-chain fatty acids on some trypanosomatid flagellates. **Journal of General Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 491–496, 1972.

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; Durand, A. Biomass estimation in solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 200–205, 1991.

DAMASCENO, F.; BARISON, M.; PRAL, E.; PAES, L.; SILBER, A. Memantine, an antagonist of the NMDA glutamate receptor, affects cell proliferation, differentiation and the intracellular cycle and induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 2717, 2014.

DESJEUX P. Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 692, 2004.

EL-SHAMI, S.; EL-MALLAH, M; HASSANEIN, M.; ABDEL-RAZEK, A. Elucidation of polynutrients and fatty acid patterns of wheat germ oil extracted by. **Journal of Applied Sciences Research**, v.7, n.12, p. 1840–1846, 2011.

FABIANE, K.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A.; ONOFRE, S. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 197–203, 2008.

FRIEDRICH, J.; ZUZEK, M.; BENCINA, M.; CIMERMAN, A.; STRANCAR, A.; RADEZ, I. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 363–367, 1995.

GEHRKE, S.; PINTO, E.; STEVERDING, D.; PLEBAN, K.; TEMPONE, A.; HIDER, R.; WAGNER, G. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 3, p. 805–813, 2013.

GRECCO, S.; FÉLIX, M.; LAGO, J.; PINTO, G.; TEMPONE, A.; ROMOFF, P.; FERREIRA, J.; SARTORELLI, P. Anti-trypanosomal phenolic derivatives from *Baccharis uncinella*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 2, p. 171–173, 2014.

GULLO, V.; HUGHES, D. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 3, 2005.

GYETVAI, A.; EMRI, T.; TAKACS, K.; DERGEZ, T.; FEKETE, A.; PESTI, M.; POCSI, I.; LENKEY, B. Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 6, p. 1140–1148, 2006.

HARVEY, A. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, 2008.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175–186, 2006.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B.; WAWER, I. NMR spectroscopy in pharmacy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 557–616, 1998.

HOTEZ, P.; FUJIWARA, R. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, p. 601–606, 2014.

HU, T.; ZHOU, Y.; DAI, L.; WANG, Y.; LIU, D.; ZHANG, J.; LIU, H. Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. **Procedia Engineering**, v. 18, p. 335–340, 2011.

JAHROMI, M.; LIANG, J.; HO, Y.; MOHAMAD, R.; GOH, Y.; SHOKRYAZDAN, P. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

JUNG, G.; UDDIN, S.; KWON, K.; CHUN, B. Comparison of supercritical and near-critical carbon dioxide extraction of carotenoid enriched wheat bran oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 45, p. 7702–7709, 2010.

KANEKO, Y.; FUKAZAWA, H.; OHNO, H.; MIYAZAKI, Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, p. 1141–1145, 2013.

KESPER, N.; DE ALMEIDA, K.; STOLF, A.; UMEZAWA, E. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 862–867, 2000.

LIU, G.; VELLUCCI, V.; STEPHANIE, K.; HOSTETTER, M. Simvastatin Inhibits *Candida albicans* Biofilm *in vitro*. **Pediatric Research**, v. 66, n. 6, p. 600–604, 2009.

LOCCI, E.; LACONI, S.; POMPEI, R.; SCANO, P.; LAI, A.; MARINCOLA, F. Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4279–4284, 2008.

MACREADIE, I.; JOHNSON, G.; SCHLOSSER, T.; MACREADIE, P. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. **Federation of European Microbiological Societies, Letters**, v. 262, p. 9–13, 2006.

MIHOS, C.; SANTANA, O. Pleiotropic effects of the HMG-CoA reductase inhibitors. **International Journal of General Medicine**, v. 4, p. 261–271, 2011.

MIRANDA, R.; GOMEZ-QUIROZ, L.; MEJIA, A.; BARRIOS-GONZALEZ, J. Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged- and solid-state fermentations. **Fungal Biology**, v. 117, p. 85–93, 2013.

MISHRA, B.; TIWARI, V. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769–4807, 2011.

LOPES, F.; STEINDORFF, A.; GERALDINE, A.; BRANDAO, R.; MONTEIRO, V.; JUNIOR, M.; COELHO, A.; ULHOA, C.; SILVA, R. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal biology**, v. 116, p. 815–824, 2012.

OSMAK, M. Statins and cancer: Current and future prospects. **Cancer Letters**, v. 324, p. 1–12, 2012.

PANSURIYA, R.; SINGHAL, R. Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 164–172, 2010.

PEI-LIAN, W.; ZHI-NAN, X.; PEI-LIN, C. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation. **Journal of Zhejiang University SCIENCE A**, v. 8, n. 9, p. 1521–1526, 2007.

PRAVEEN V.; SAVITHA J. Solid state fermentation: An effective method for Lovastatin production by fungi over submerged fermentation. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 15–21, 2012.

PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HÖLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 211–221, 2014.

QUINTERO, C.; ATANASOVA, L.; MOLANO, E.; GAMS, W.; ZELAZOWSKA, M.; THEELEN, B.; MULLER, W.; BOEKHOUT, T.; DRUZHININA, I. DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 657–674, 2013.

QUEVEDO, B.; NARVAÉZ, P.; PEDROZA, A.; VELÁSQUEZ, M. Degradation of *Chrysanthemum (Dendranthema grandiflora)* Wastes by *Pleurotus ostreatus* for the Production of Reducing Sugars. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 1103–1112, 2012.

RAZINGER, J.; LUTZ, M.; SCHROERS, H.; PALMISANO, M.; WOHLER, C.; UREK, G.; GRUNDER, J. Direct plantlet inoculation with soil or insect-associated fungi may control cabbage root fly maggots. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.120, p. 59–66, 2014.

REIMÃO, J.; MIGOTTO, A.; KOSSUGA, M.; BERLINCK, R.; TEMPONE, A. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. **Parasitology Research**, v. 103, n. 6, p.1445–50, 2008.

REIS, T. **Micobiota e ocorrência de micotoxinas em amostras de castanha-do-Brasil provenientes de diferentes estados brasileiros**. 2014. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2014.

RISHTON, G. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, 2008.

ROJAS, J. **Prospecção de genes biossintéticos de policetídeos a partir de fungos isolados de cana de açúcar**. 2010. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ROZE, L.; MAHANTI, N.; MEHIGH, R.; MCCONNELL, D.; LINZ, J. Evidence That MRas1 and MRas3 Proteins Are Associated with Distinct Cellular Functions during Growth and Morphogenesis in the Fungus *Mucor racemosus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 28, p. 171–189, 1999.

ROZE, L.; LINZ, J. Lovastatin Triggers an Apoptosis-like Cell Death Process in the Fungus *Mucor racemosus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 25, p. 119–133, 1998.

SAMUELS, G.; DODD, S.; LU, B.; PETRINI, O.; SCHROERS, H.; DRUZHININA, I. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 67–133, 2006.

SANTOS, L.; CAVALHEIRO, A.; TEMPONE A.; CORREA D.; ALEXANDRE T.; QUINTILIANO N.; RODRIGUES-OLIVEIRA A.; OLIVEIRA-SILVA D.; MARTINS R.; LAGO J. Antitrypanosomal Acetylene Fatty Acid Derivatives from the Seeds of *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8168–8180, 2015.

SANTOS, A.; GARCÍA, M.; COTES, A.; VILLAMIZAR, L. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 3, p. 150–156, 2012.

SAMIEE, S.; MOAZAMI, N.; HAGHIGHI, S.; MOHSENI, F.; MIRDAMADI, S.; BAKHTIARI, M. Screening of Lovastatin Production by Filamentous Fungi. **Iranian Biomedical Journal**, v. 7, n. 1, p. 29-33, 2003.

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI, R.; SINGH, H. *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 195–206, 2015.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 117–125, 2004.

SCHMIDT, C.; FURLONG, E. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 36–41, 2012.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 491–502, 2003.

SUN, R.; LIU, Z.; FU, K.; FAN, L.; CHEN, J. *Trichoderma* biodiversity in China. **Journal of Applied Genetics**, v. 53, p. 343–354, 2012.

URBINA, J. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches, **Acta Tropical**, v. 115, p. 55–68, 2010.

VALERA, H.; GOMES, J.; LAKSHMI, S.; GURURAJA, R.; SURYANARAYAN, S.; KUMAR, D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 521–526, 2005.

WANG, Q.; YAN, J.; CHEN, X.; LI, J.; YANG, Y.; WENG, J.; DENG, D.; YENARI, M. Statins: Multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurology**, v. 230, p. 27–34, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet, n. 340. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 04 Jul. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Fact sheet, n. 375. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 04 Julho.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases. Fact sheet, n. 317. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acesso em: 11 Março 2013.

WOLIN, M.; MILLER, T. Control of rumen methanogenesis by inhibiting the growth and activity of methanogens with hydroxymethylglutaryl-SCoA inhibitors. **International Congress Series**, v. 1293, p. 131–137, 2006.

XIA, X.; LIE, T.; QIAN, X.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Species Diversity, Distribution, and Genetic Structure of Endophytic and Epiphytic *Trichoderma* Associated with Banana Roots. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 619–625, 2011.

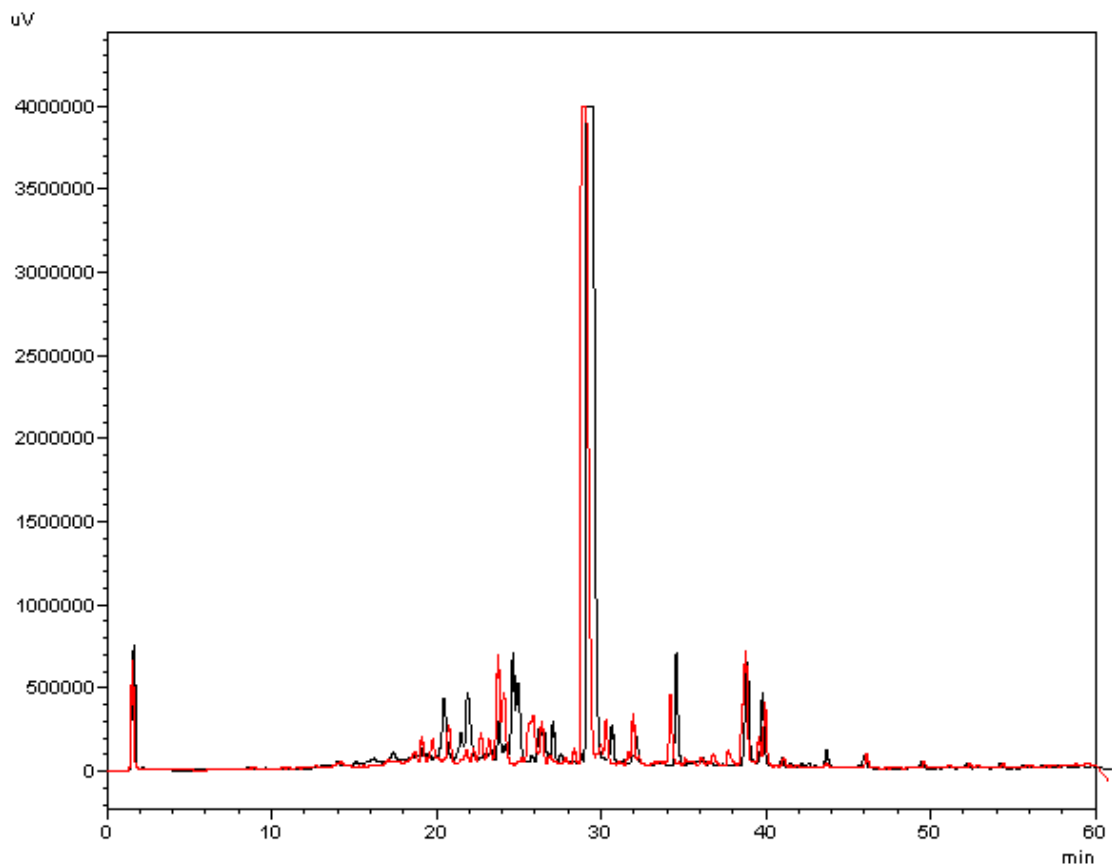
ZHANG, J.; OSAWA, S.; TAKAYANAGI, Y.; IKUMA, M.; YAMADA, T.; SUGIMOTO, M.; FURUTA, T.; MIYAJIMA, H.; SUGIMOTO, K. Statins directly suppress cytokine production in murine intraepithelial lymphocytes. **Cytokine**, v. 61, p. 540–545, 2013a.

ZHANG, J.; YANG, Z.; XIE, L.; XU, L.; XU, D.; LIU, X. Statins, autophagy and cancer metastasis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 745–752, 2013b.

APÊNDICE A – Comparação dos cromatogramas segundo o dia de cultivo

Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *A. terreus* segundo **o dia de cultivo**

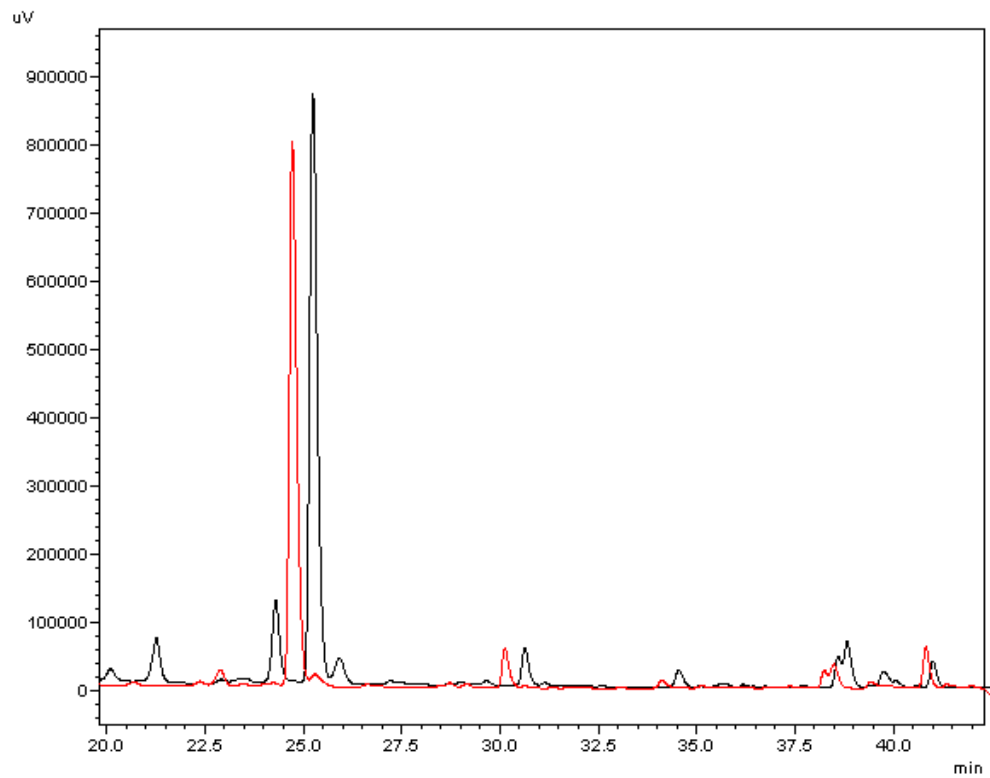
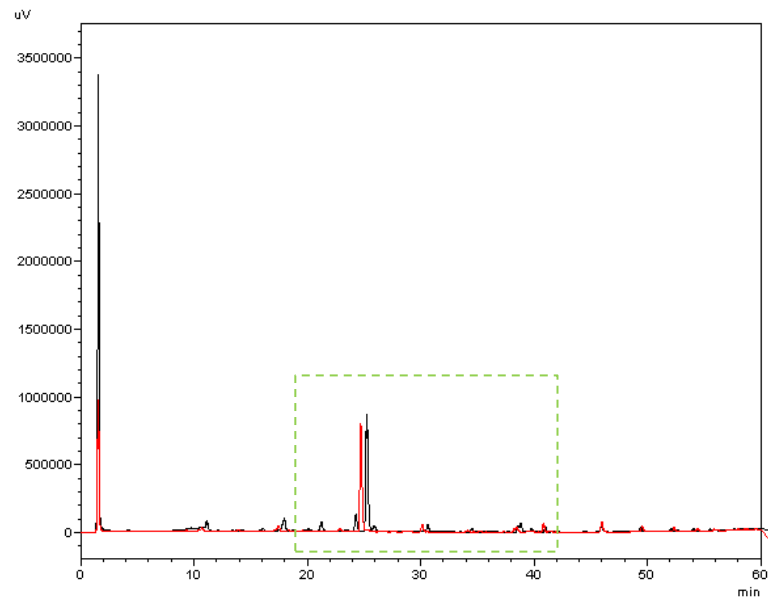
7 dias de cultivo - Preto
15 dias de cultivo - **Vermelho**



Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *Saccharicola* sp. segundo o **dia de cultivo**

7 dias - Preto

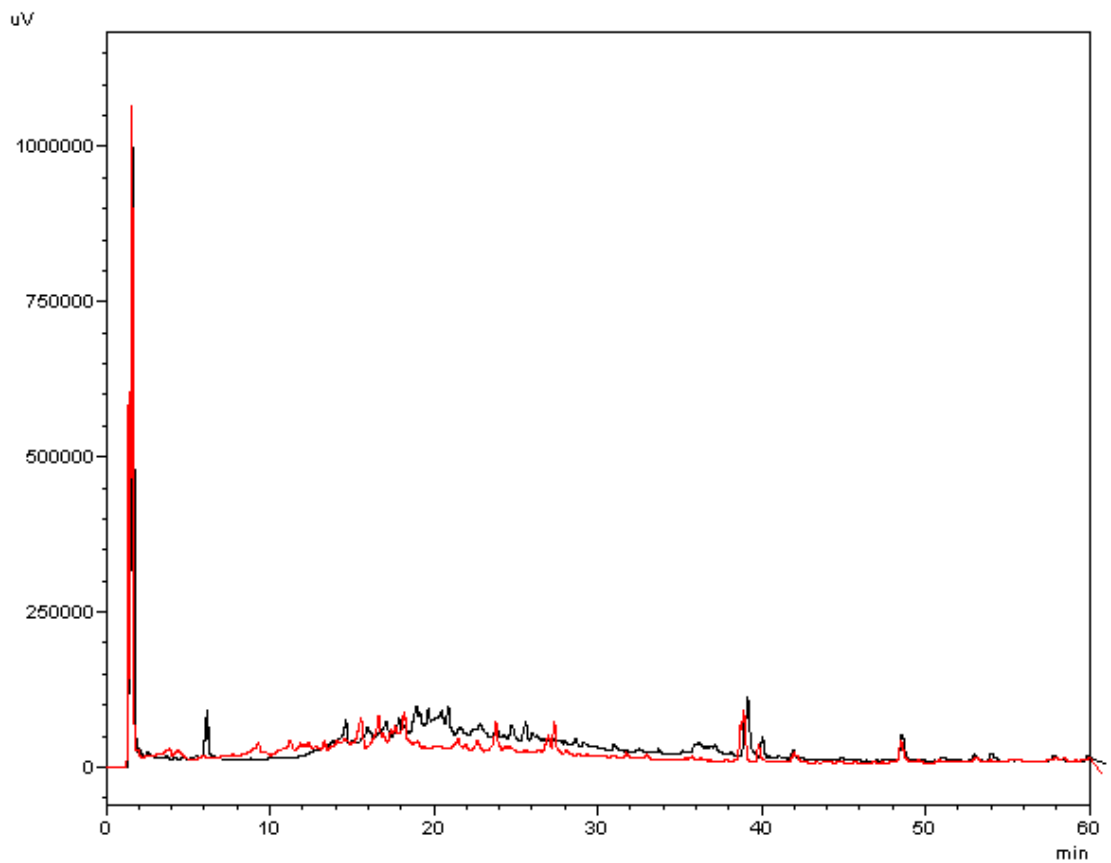
15 dias - Vermelho



Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *A. flavus* segundo o **dia de cultivo**

7 dias - Preto

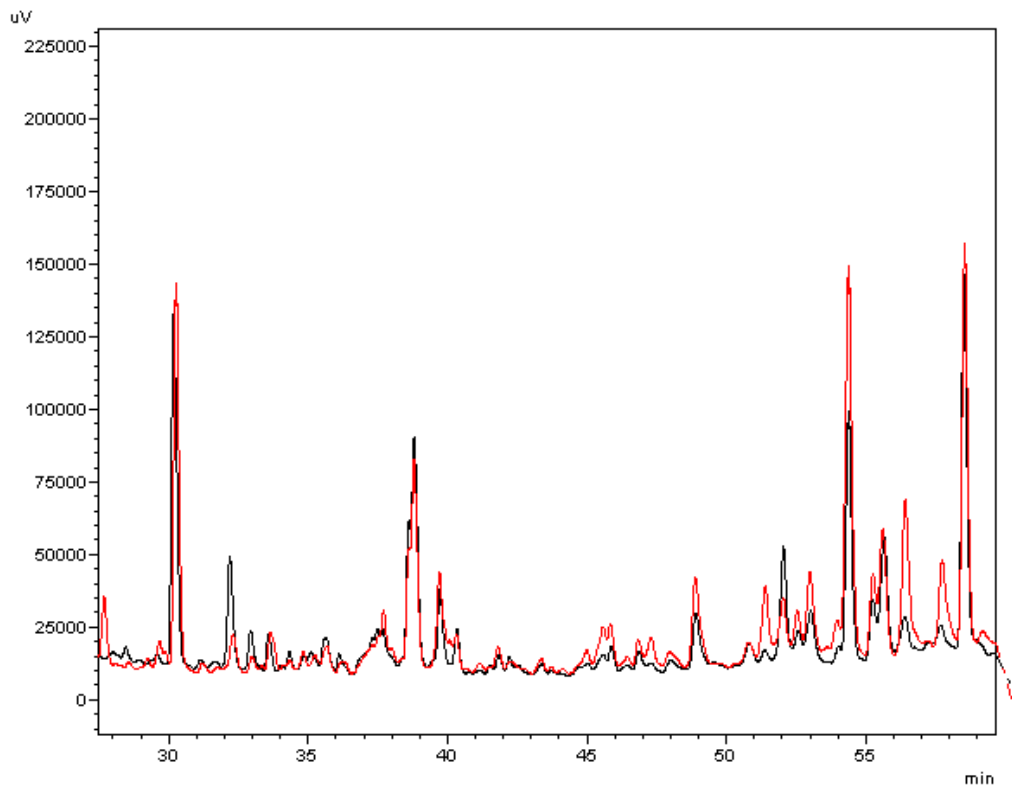
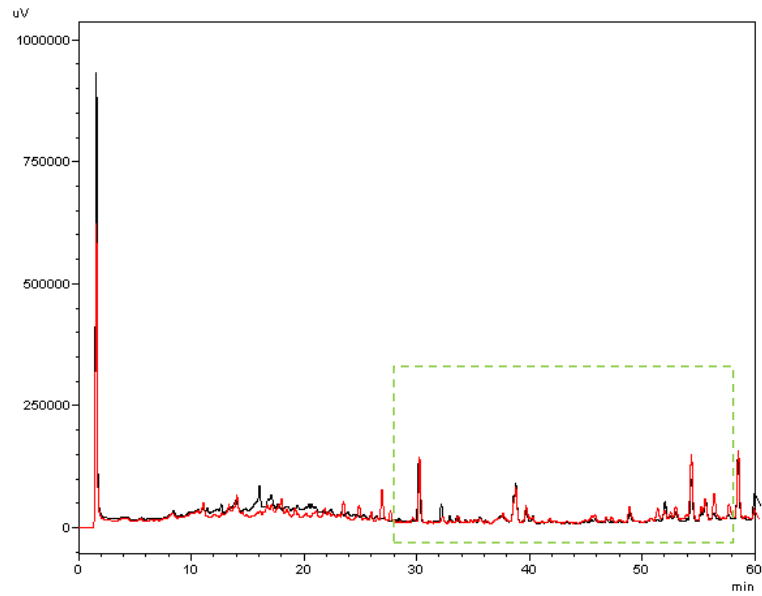
15 dias - Vermelho



Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *P. pinophilum* segundo o **dia de cultivo**

7 dias - Preto

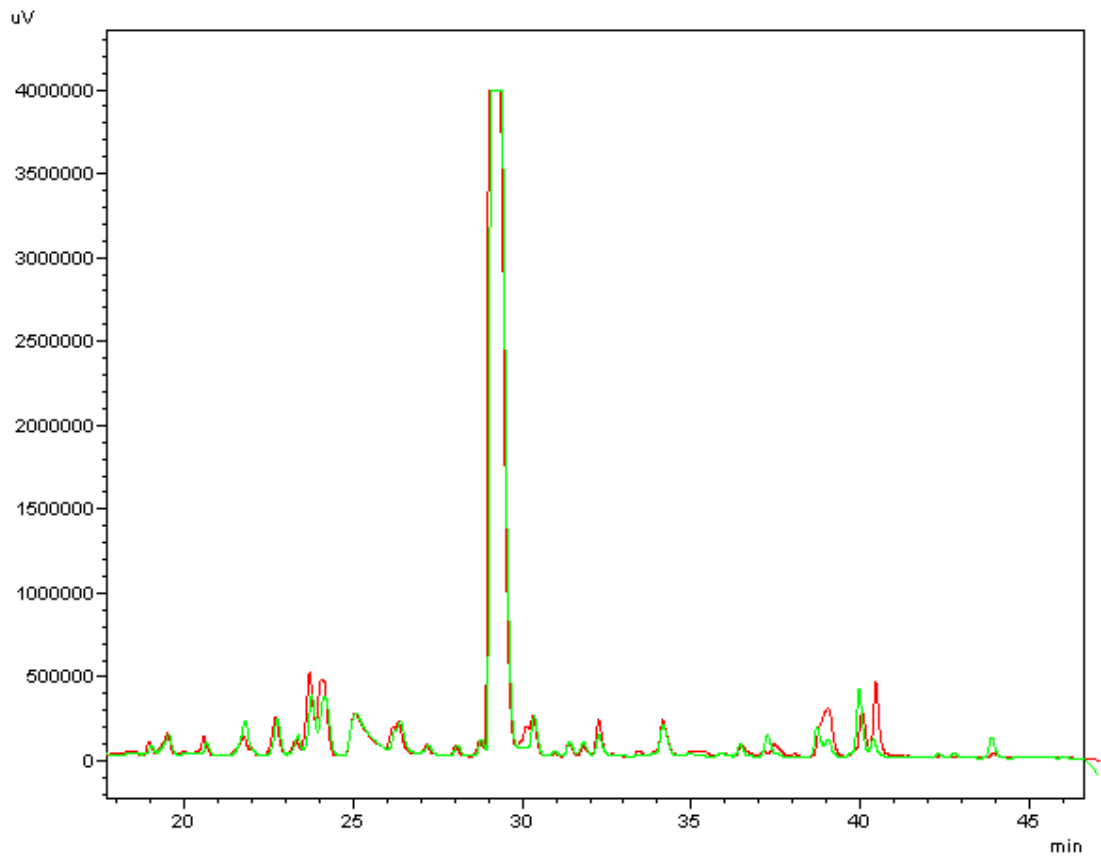
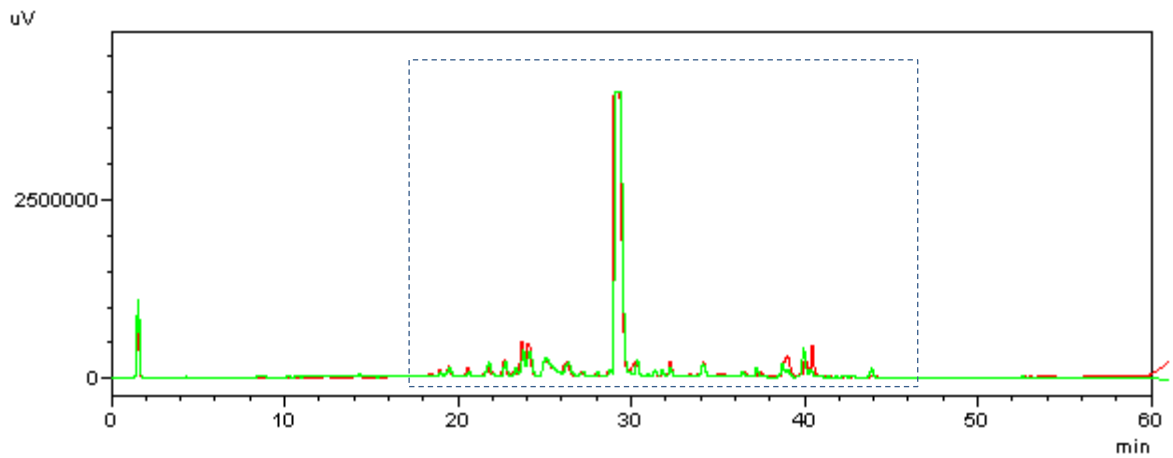
15 dias - Vermelho



APÊNDICE B - Comparação dos cromatogramas segundo o método de extração

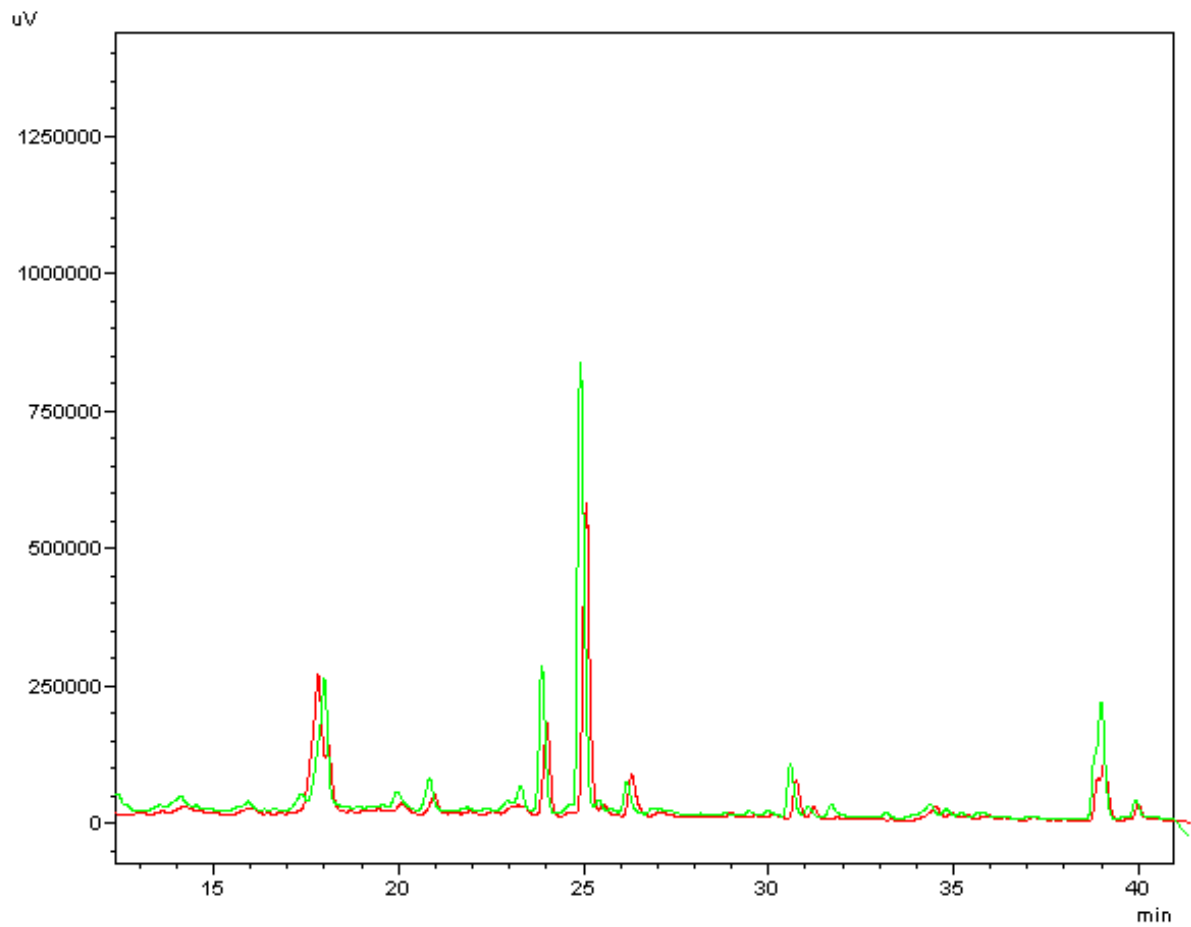
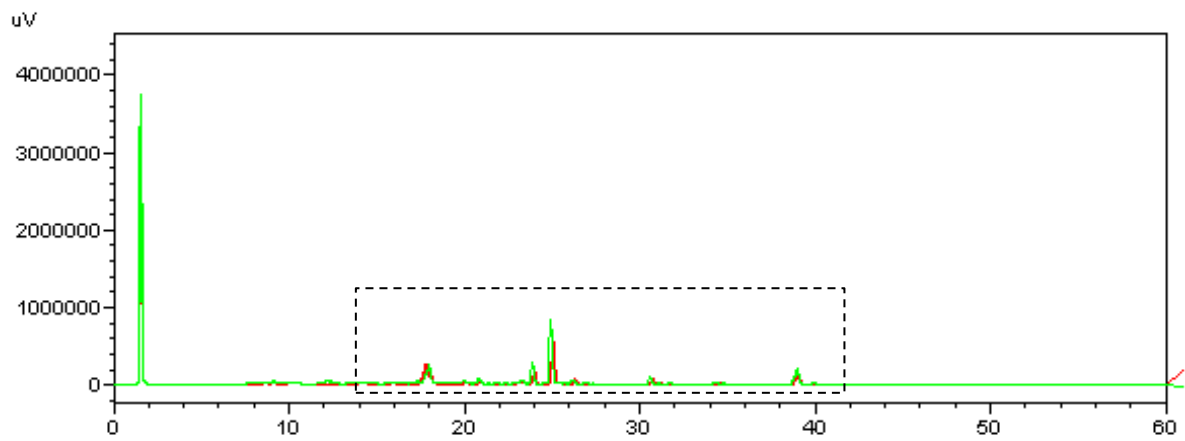
Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *A. terreus* segundo o **método de extração**

Nitrogênio - Verde
Secagem - Vermelho



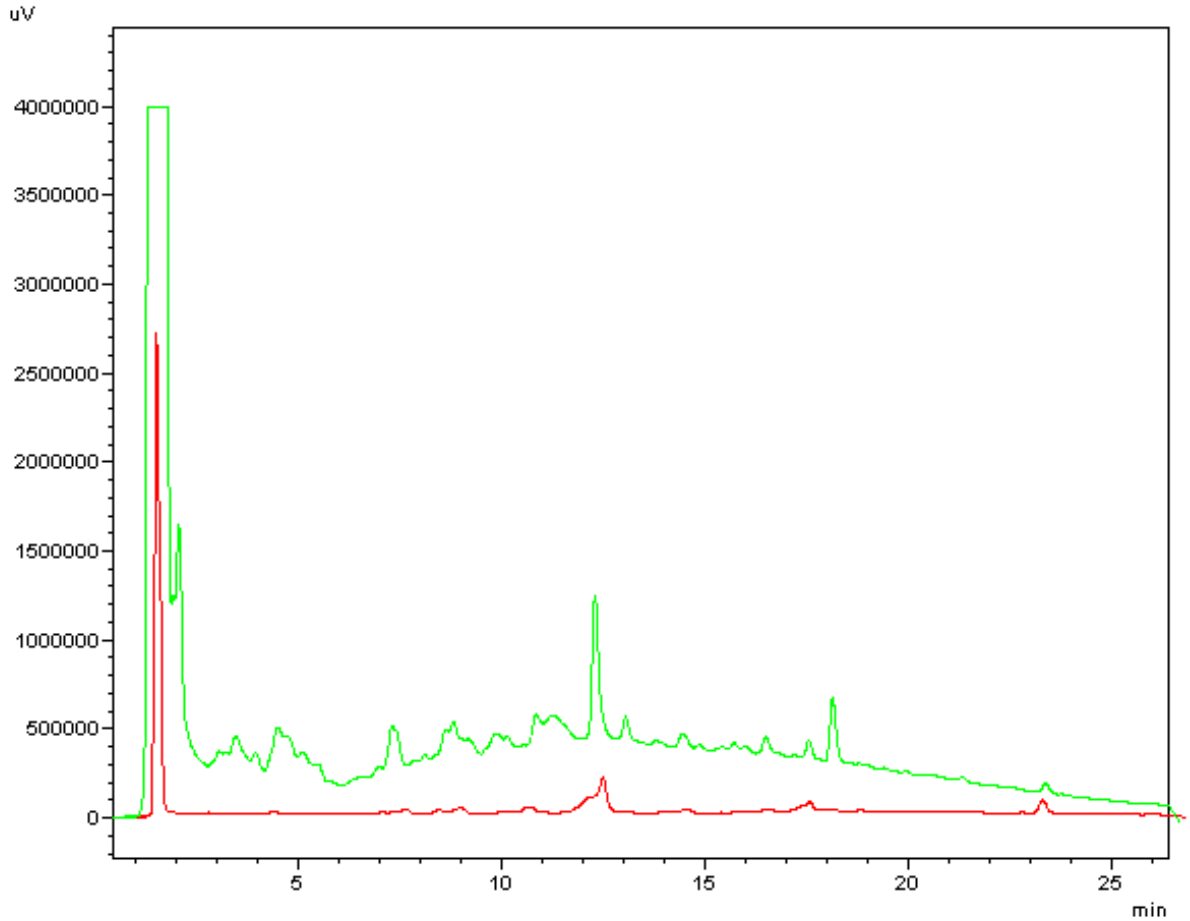
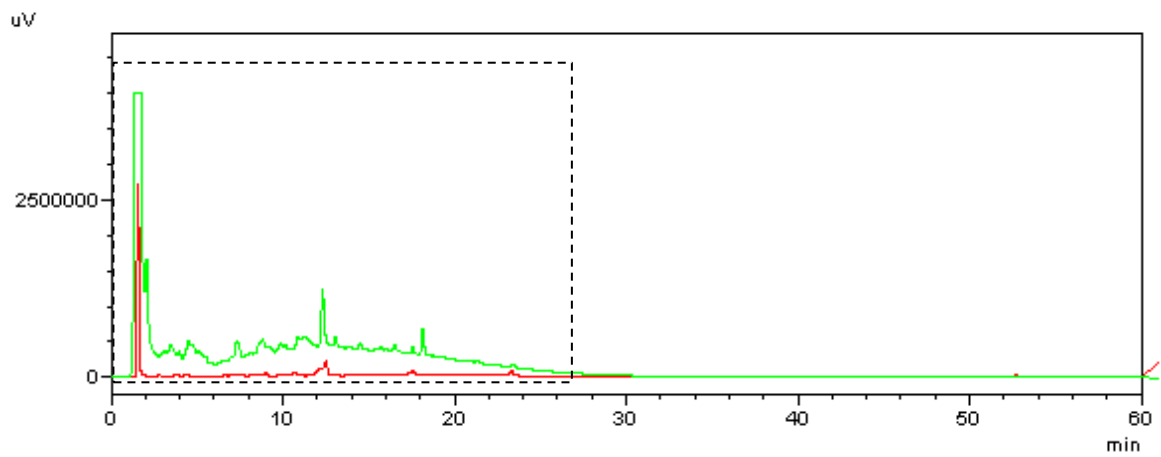
Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *Saccharicola* sp segundo o **método de extração**.

Nitrogênio - Verde
Secagem - Vermelho



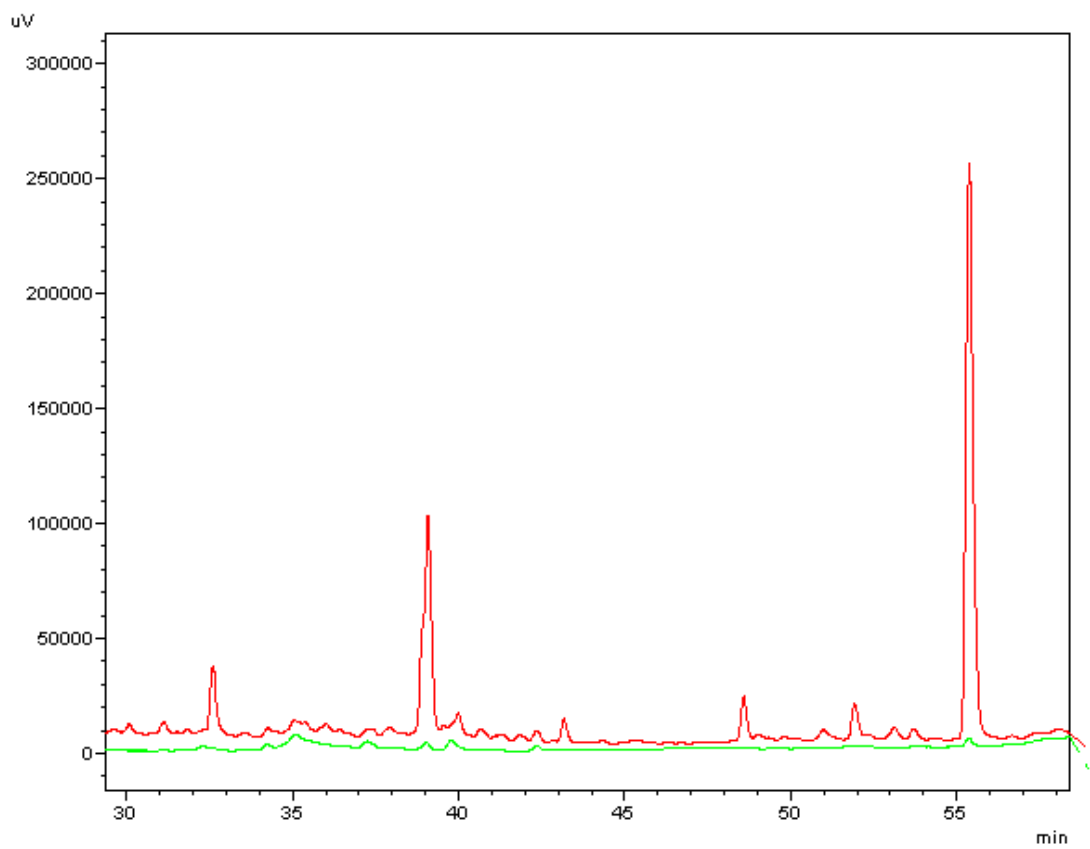
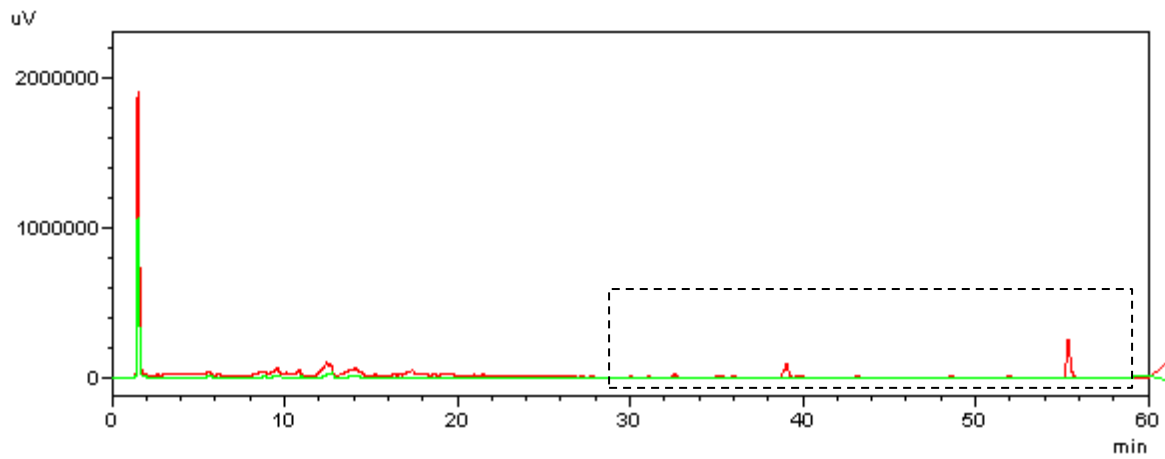
Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *Fusarium* sp. segundo o **método de extração**.

Nitrogênio - Verde
Secagem - Vermelho



Comparação dos cromatogramas (238nm) dos extratos do cultivo do fungo *Trichoderma* sp. segundo o **método de extração**.

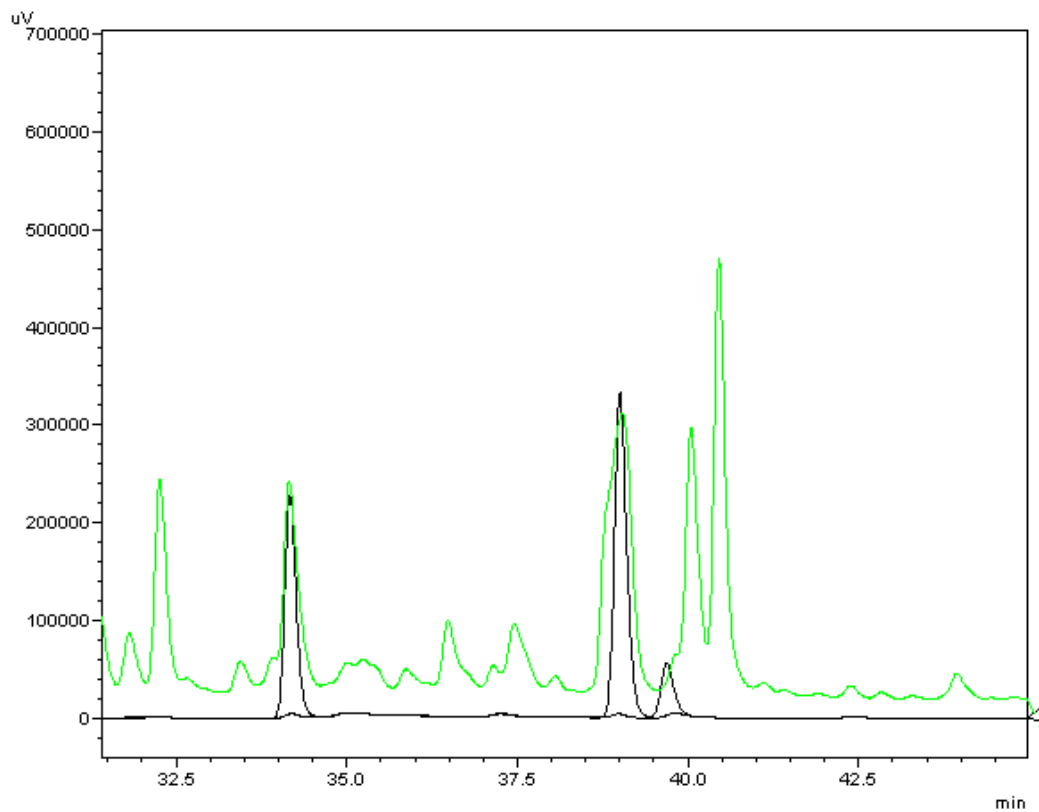
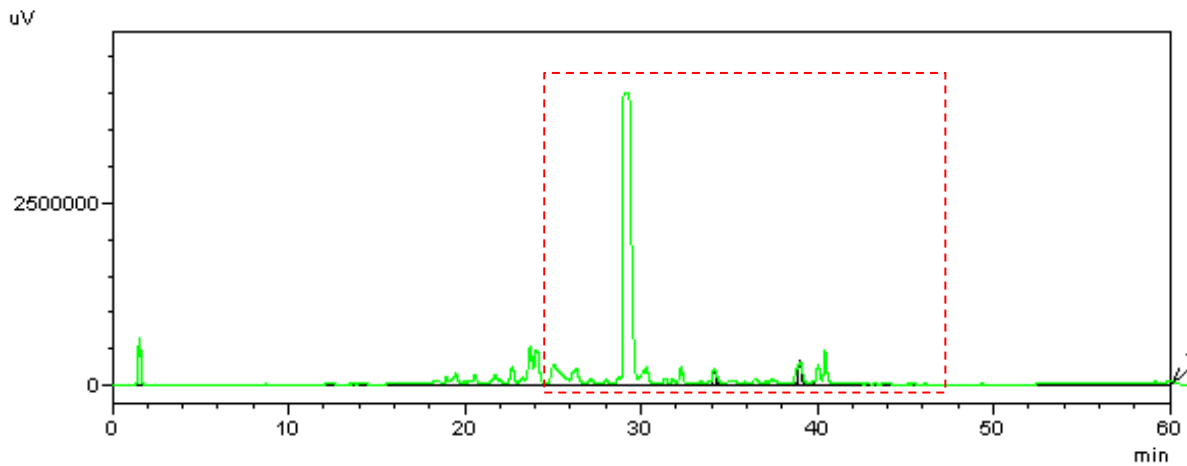
Nitrogênio - Verde
Secagem - Vermelho



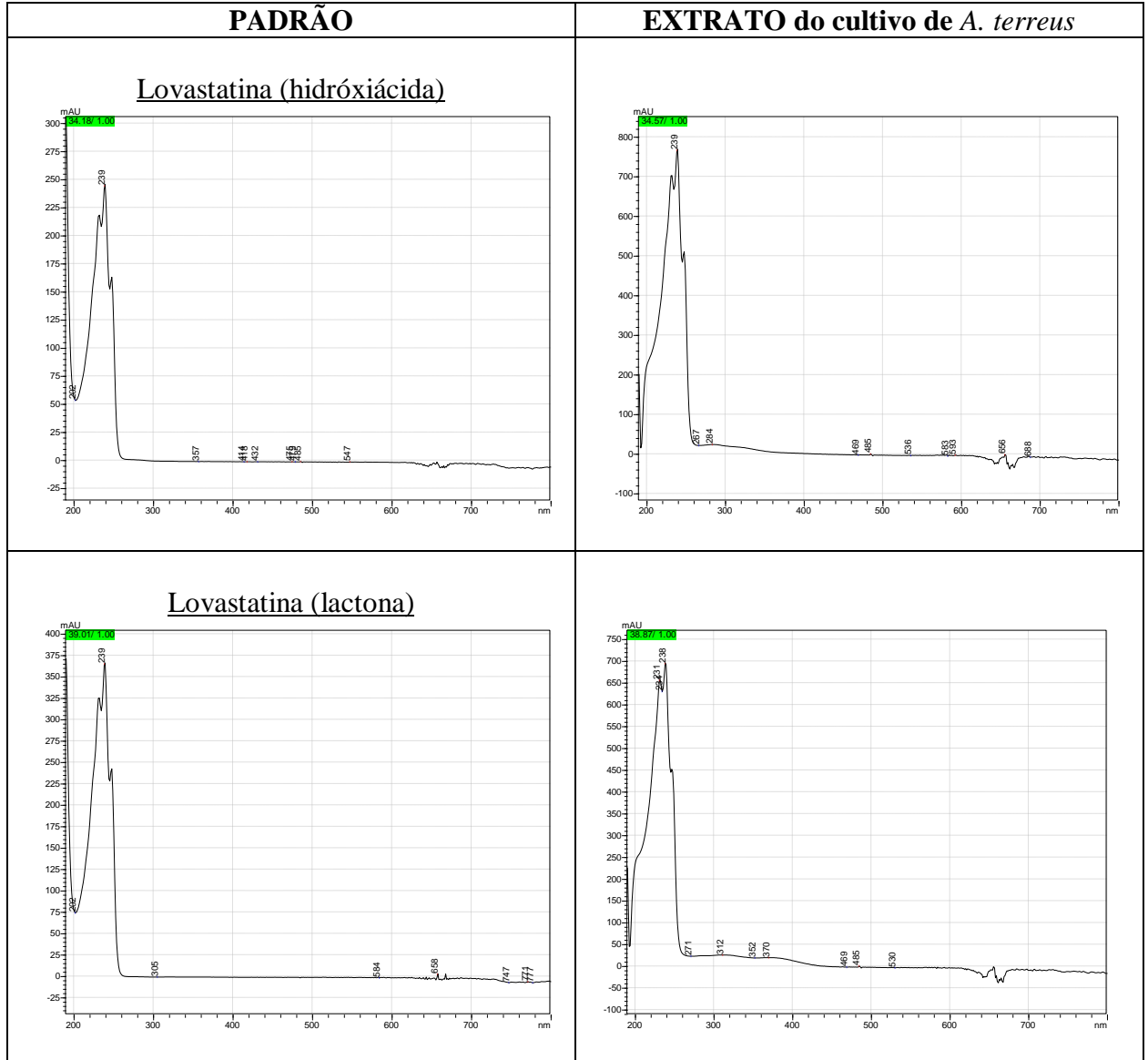
APÊNDICE C –

Comparação dos cromatogramas e espectros de absorção (Extratos vs. Padrão Lovastatina)

Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *A. terreus* e das soluções padrão de Lovastatina (50 µg/mL)

Padrão Lovastatina – PretoTempo de retenção (min) forma hidróxi-ácida: **39.01**Tempo de retenção (min) forma lactona: **34.18****Extrato – Verde**

COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO



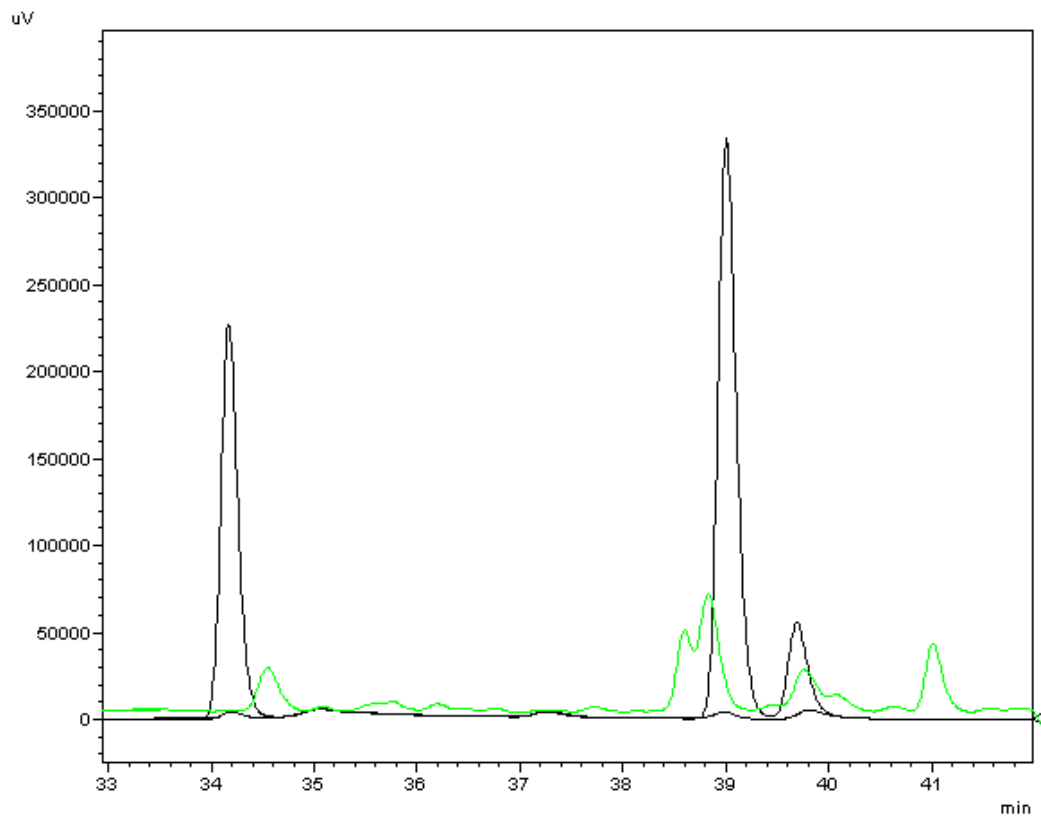
Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *Saccharicola* sp. e das soluções padrão de Lovastatina (50 µg/mL)

Padrão Lovastatina – Preto

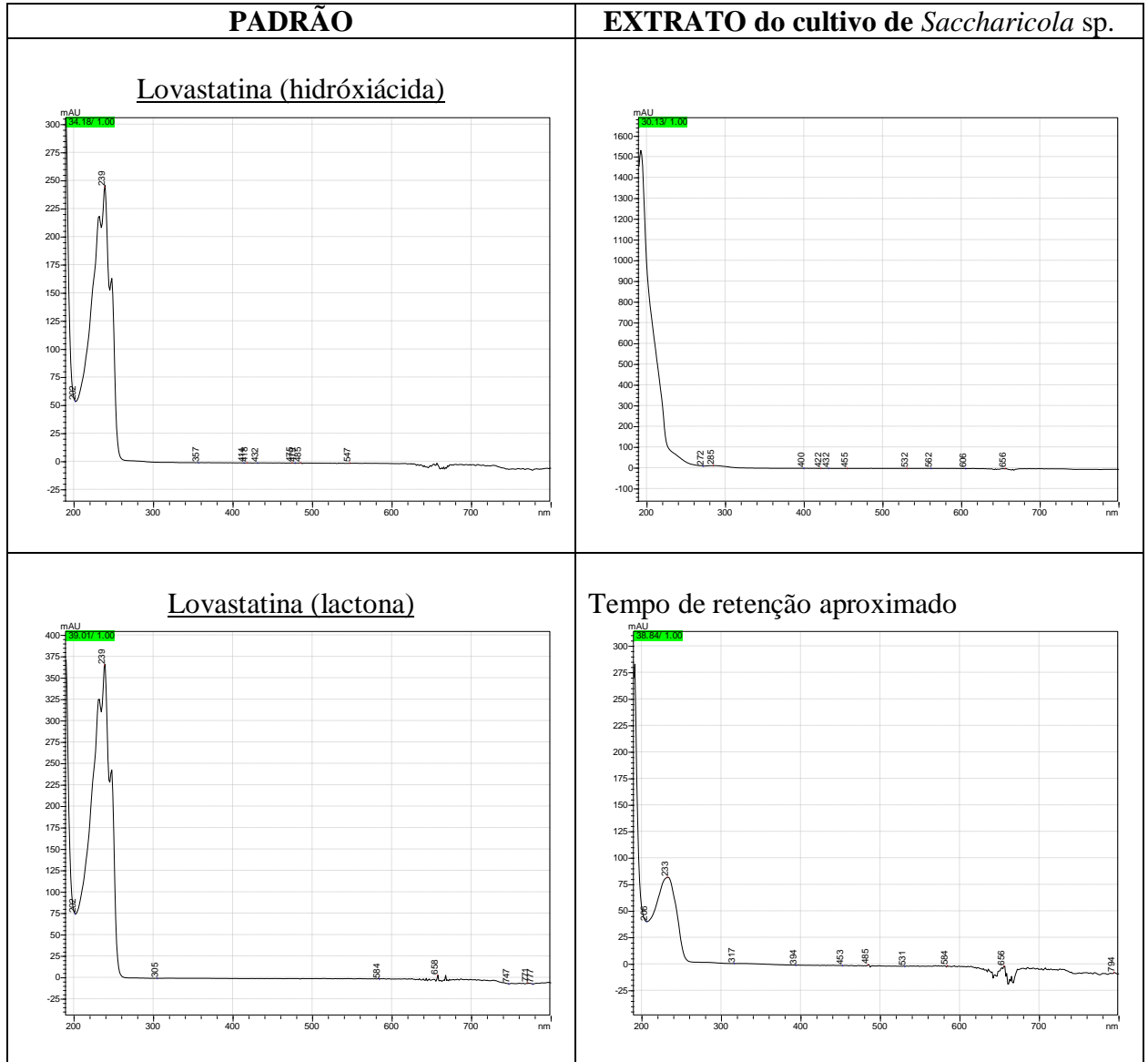
Tempo de retenção (min) forma hidróxi-ácida: **39.01**

Tempo de retenção (min) forma lactona: **34.18**

Extrato – Verde



COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO



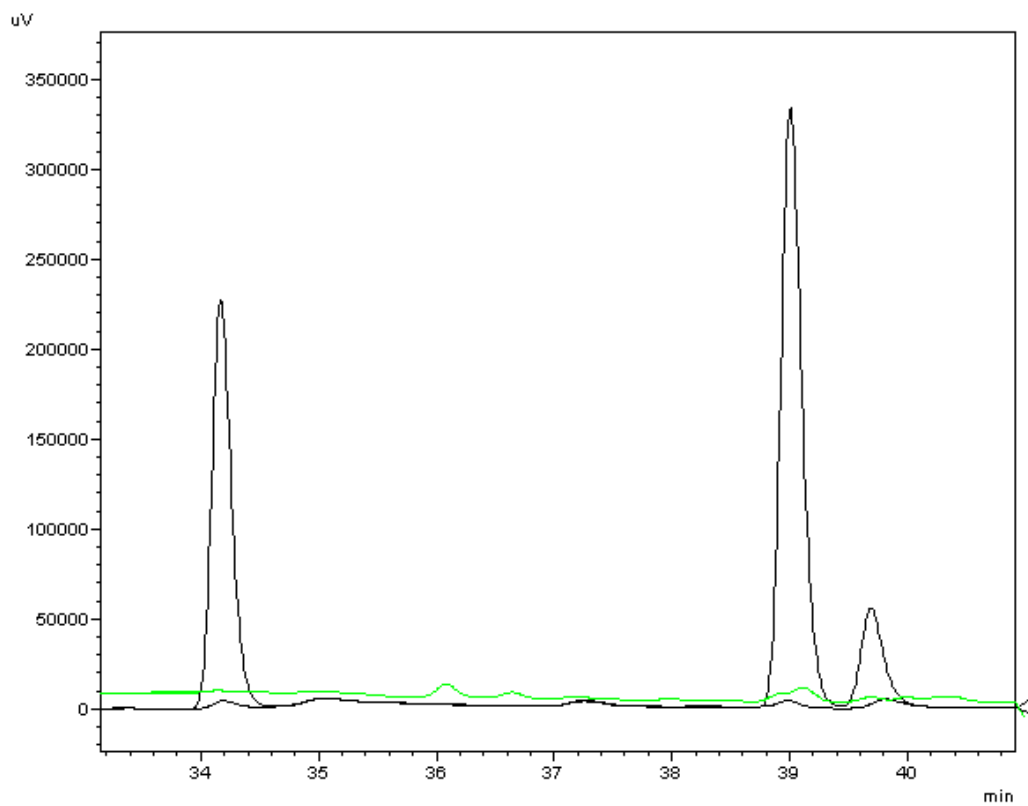
Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *Fusarium* sp. e das soluções padrão de Lovastatina (50 µg/mL)

Padrão Lovastatina – Preto

Tempo de retenção (min) forma hidróxi-ácida: **39.01**

Tempo de retenção (min) forma lactona: **34.18**

Extrato – Verde



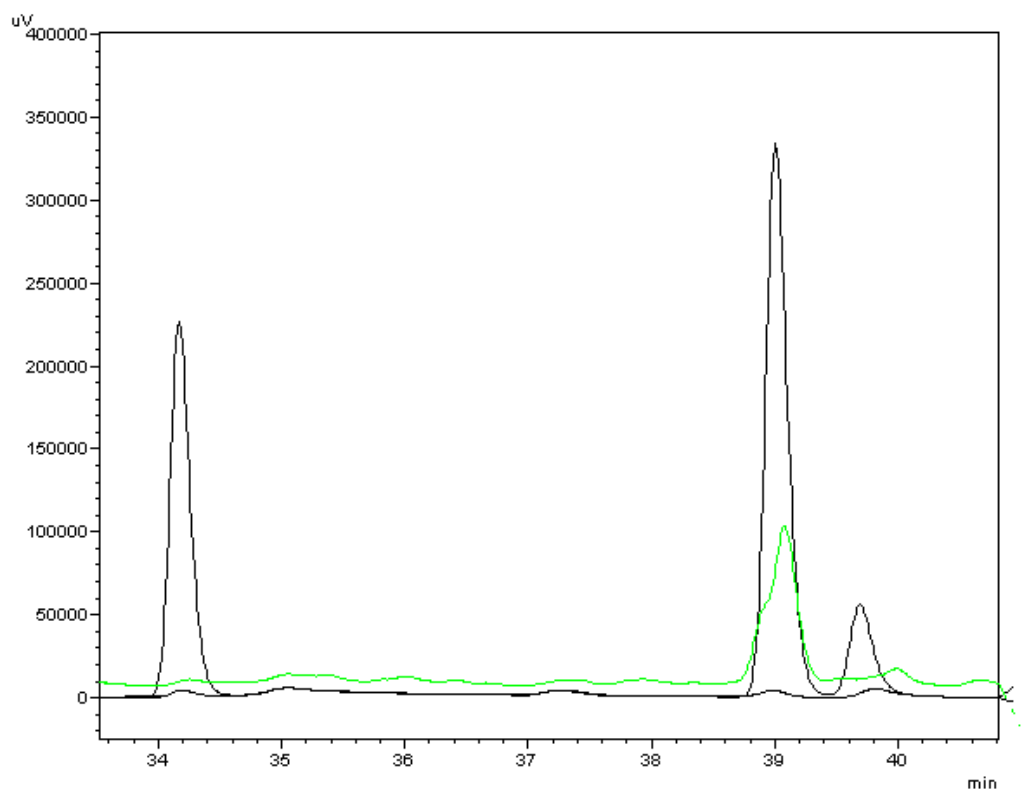
Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *Trichoderma* sp. e das soluções padrão de Lovastatina (50 µg/mL)

Padrão Lovastatina – Preto

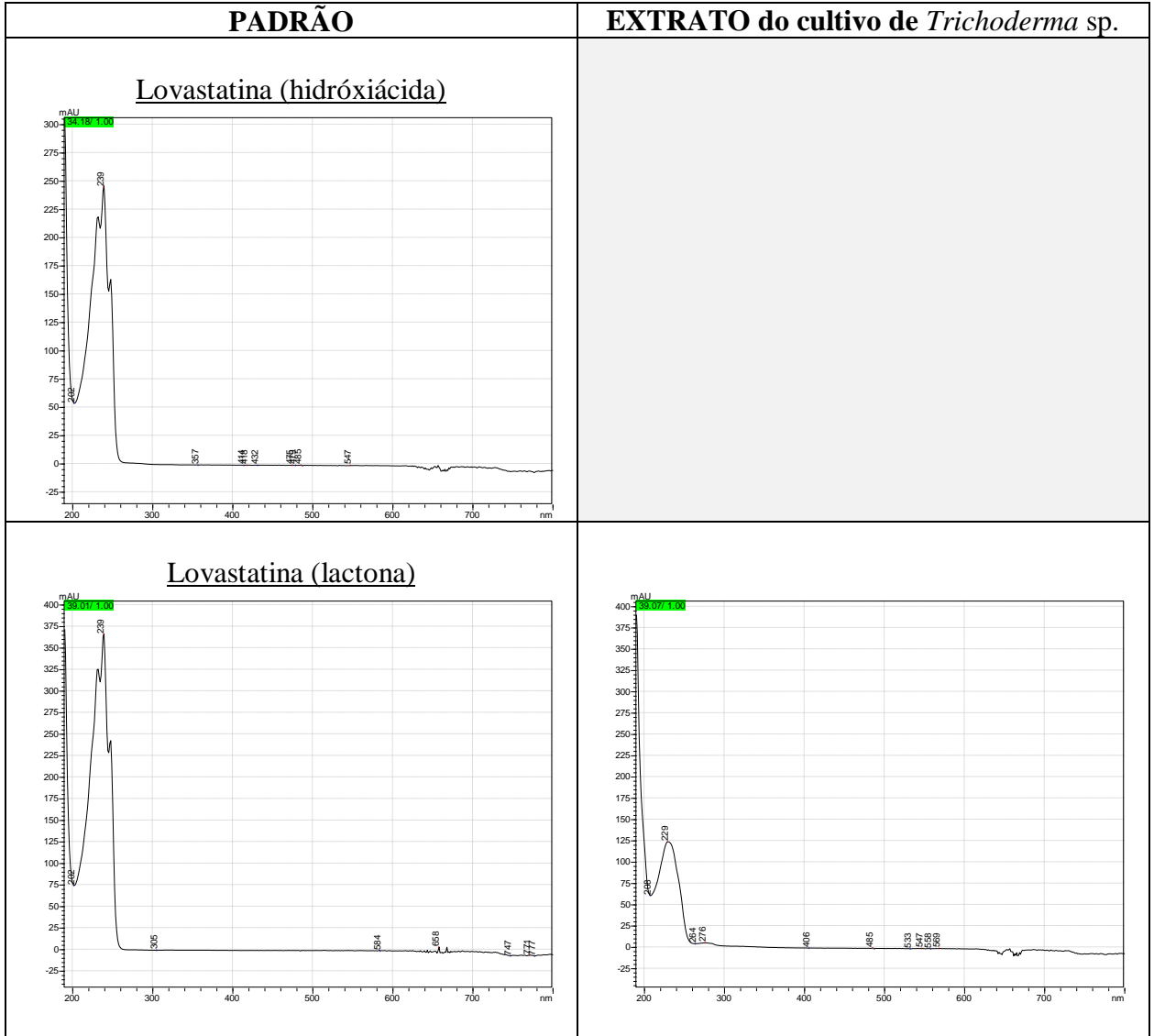
Tempo de retenção (min) forma hidróxi-ácida: **39.01**

Tempo de retenção (min) forma lactona: **34.18**

Extrato – Verde



COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO



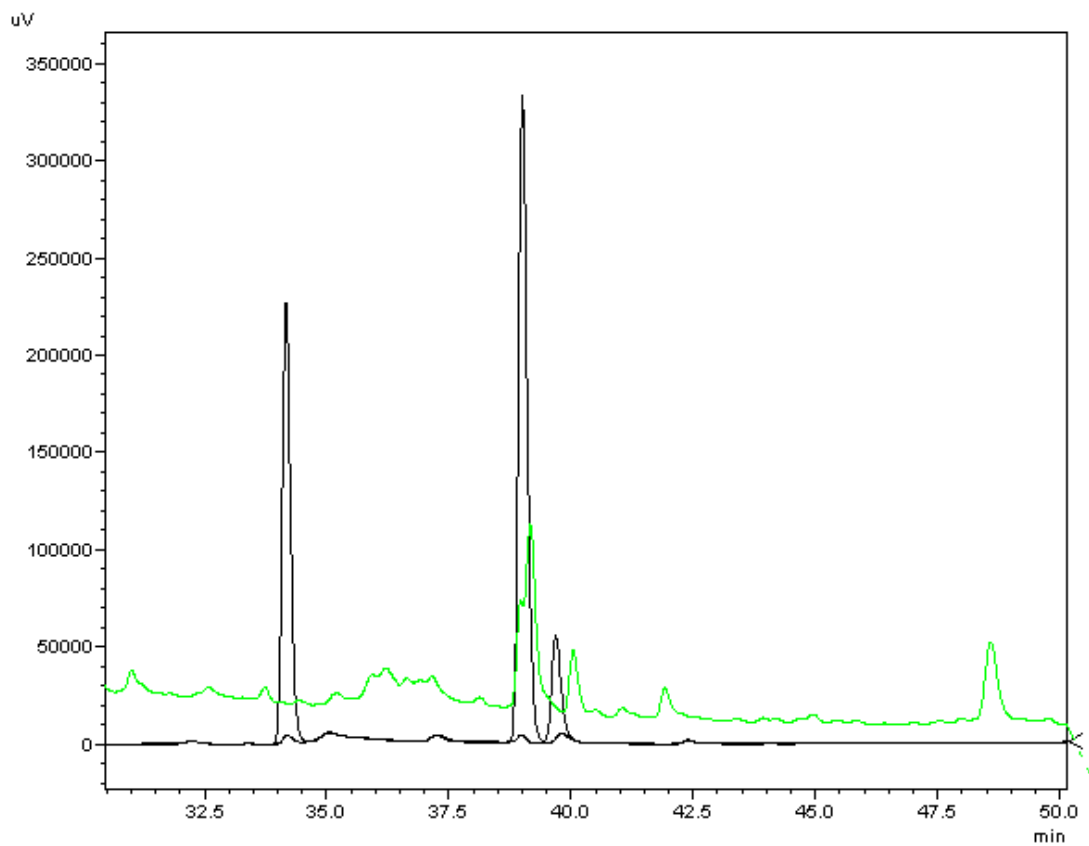
Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *A. flavus* e das soluções padrão de Lovastatina (50 µg/mL)

Padrão Lovastatina – Preto

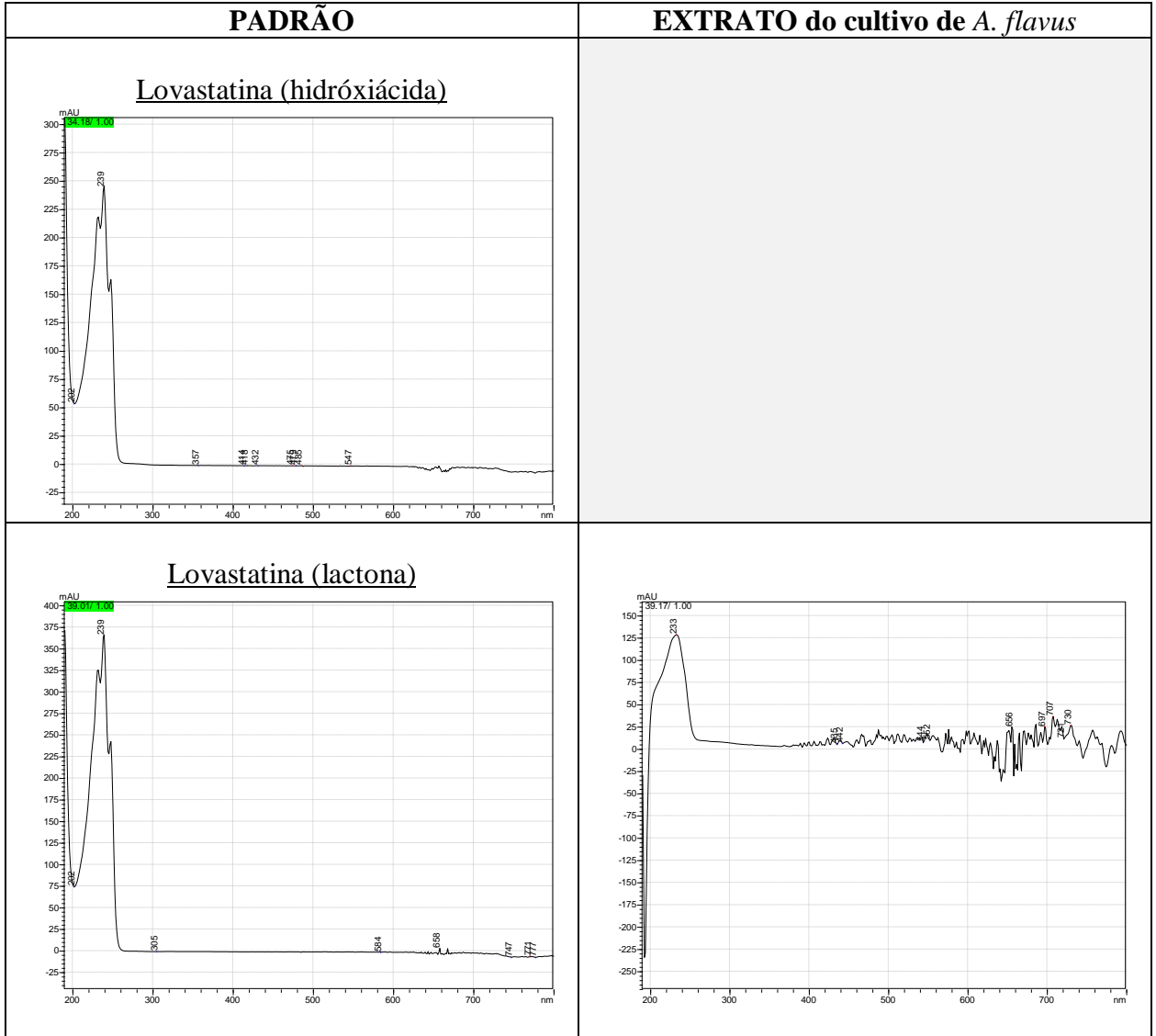
Tempo de retenção (min) forma hidróxi-ácida: **39.01**

Tempo de retenção (min) forma lactona: **34.18**

Extrato – Verde



COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO



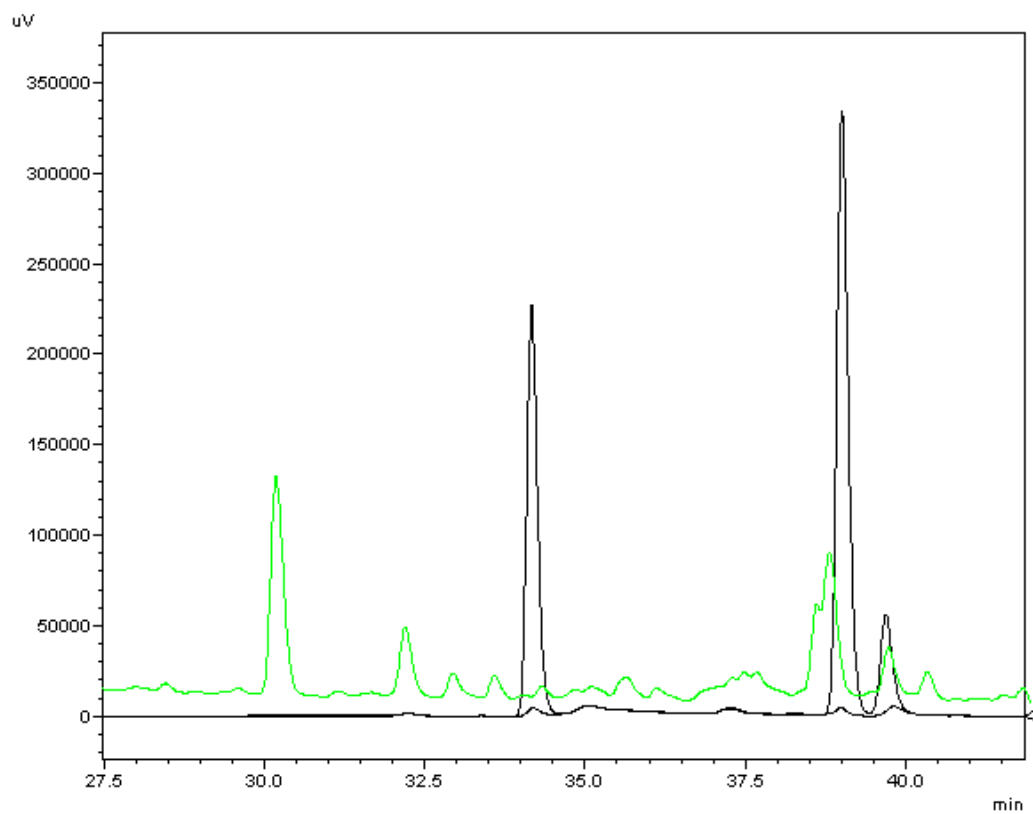
Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *P. pinophilum* e das soluções padrão de Lovastatina (50 µg/mL)

Padrão Lovastatina – Preto

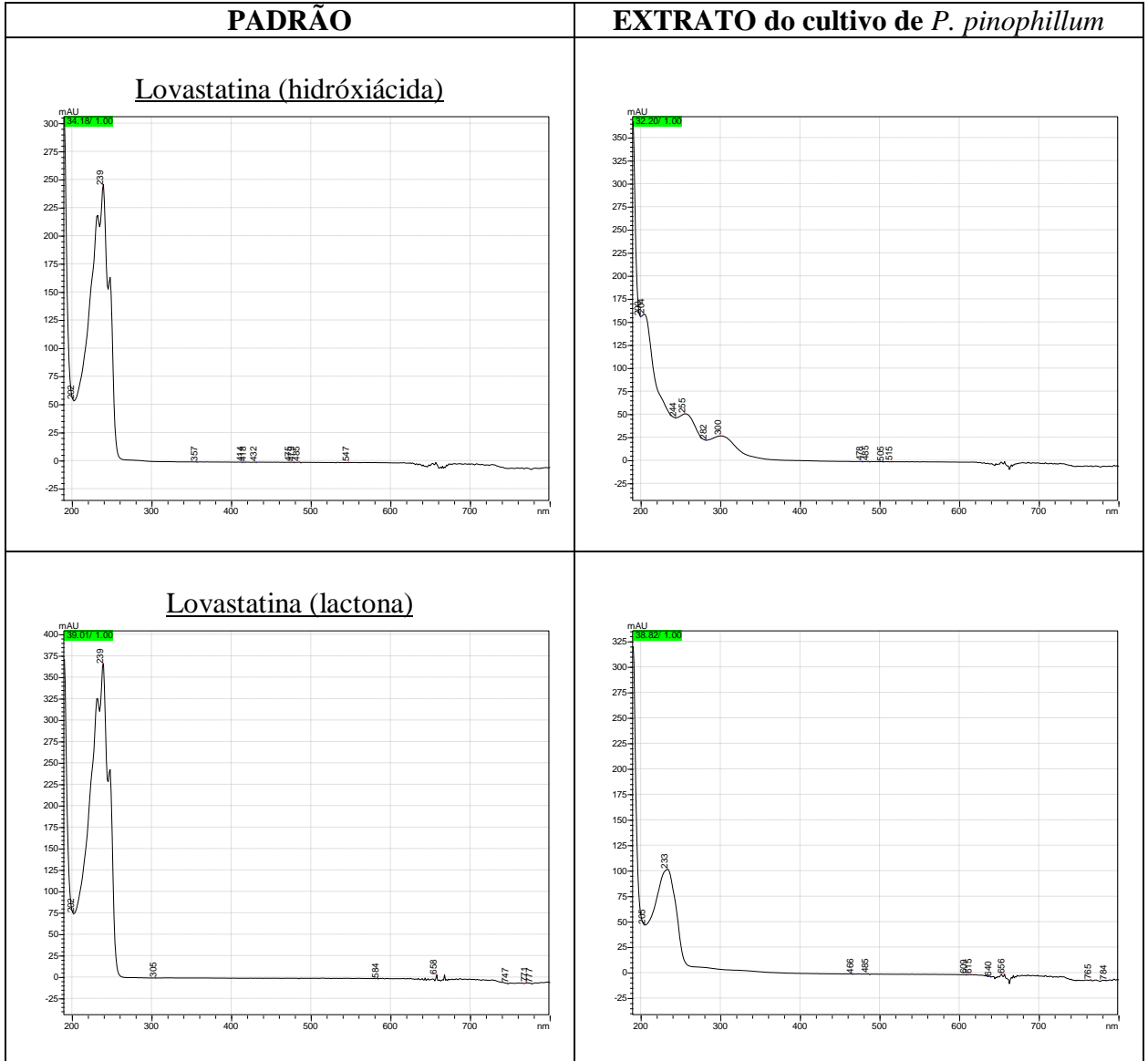
Tempo de retenção (min) forma hidróxi-ácida: **39.01**

Tempo de retenção (min) forma lactona: **34.18**

Extrato – Verde



COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO



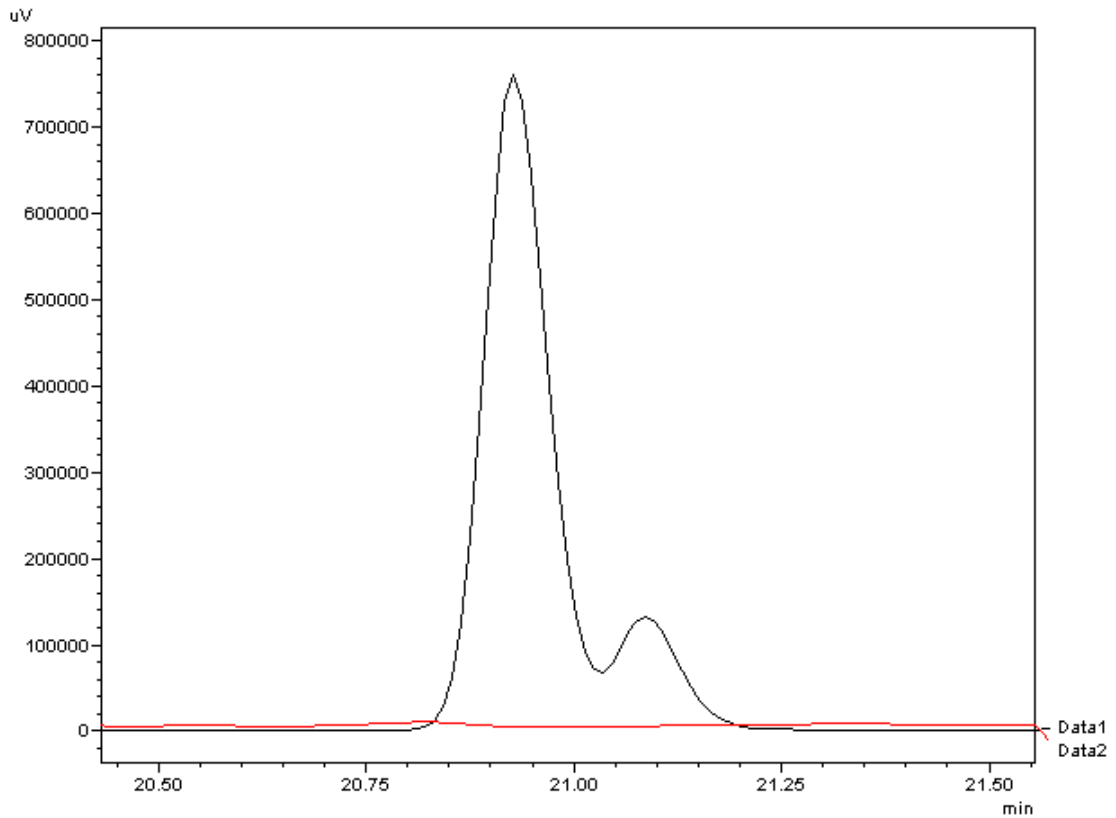
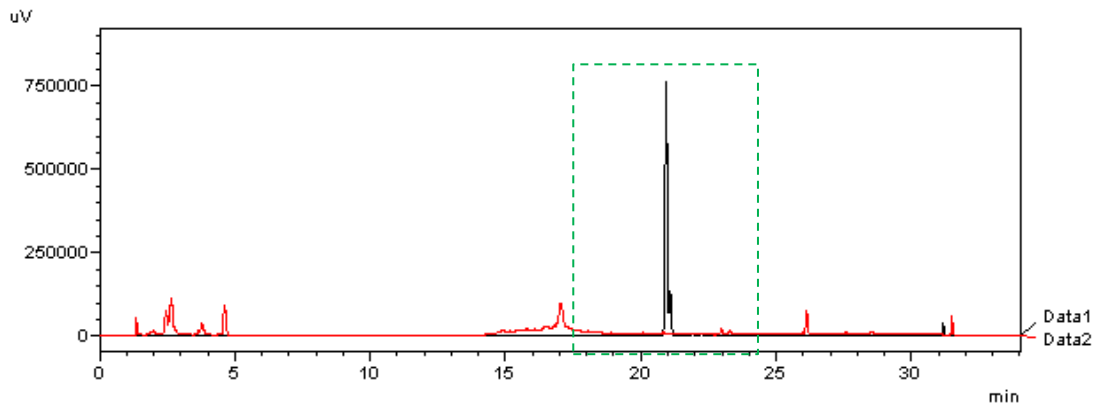
APÊNDICE D – Comparação dos cromatogramas ETAPA II
(Extratos vs. Padrão Lovastatina)

Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *Trichoderma* sp. e da solução padrão de Lovastatina (forma lactona) 50 µg/mL

Padrão Lovastatina – Preto

Tempo de retenção (min) forma lactona: **20.93**

Extrato – Vermelho

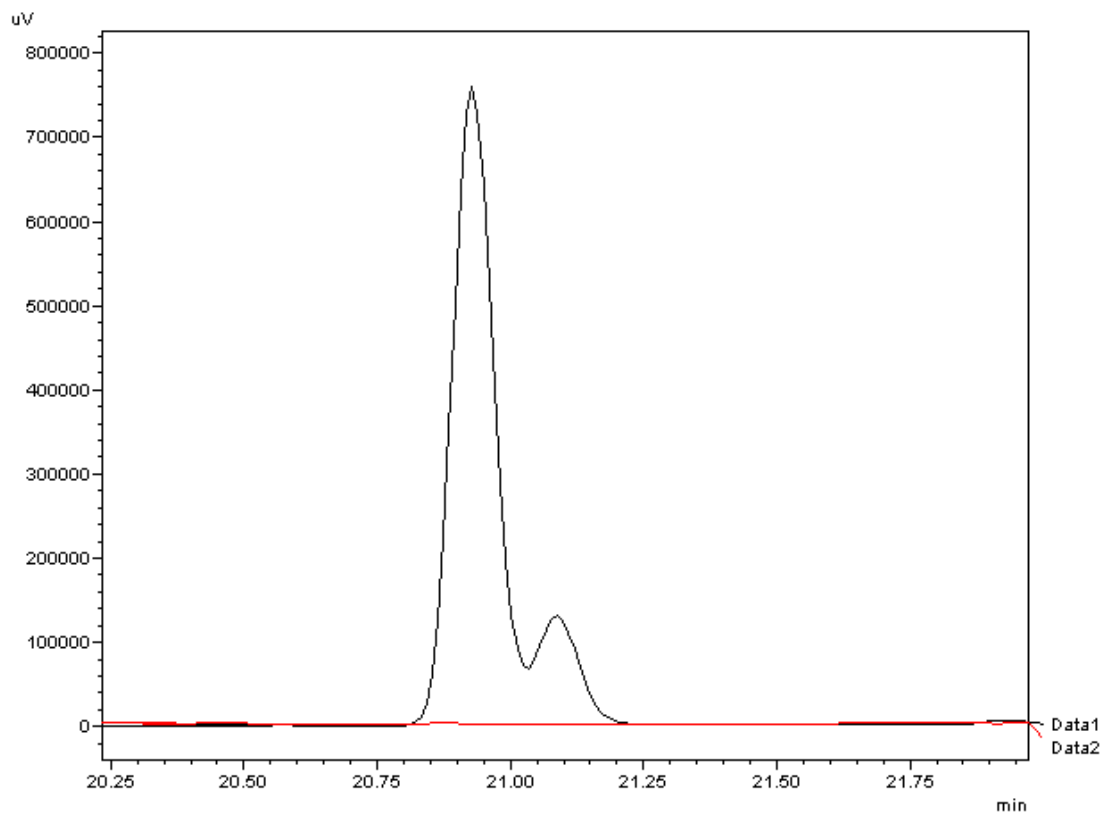
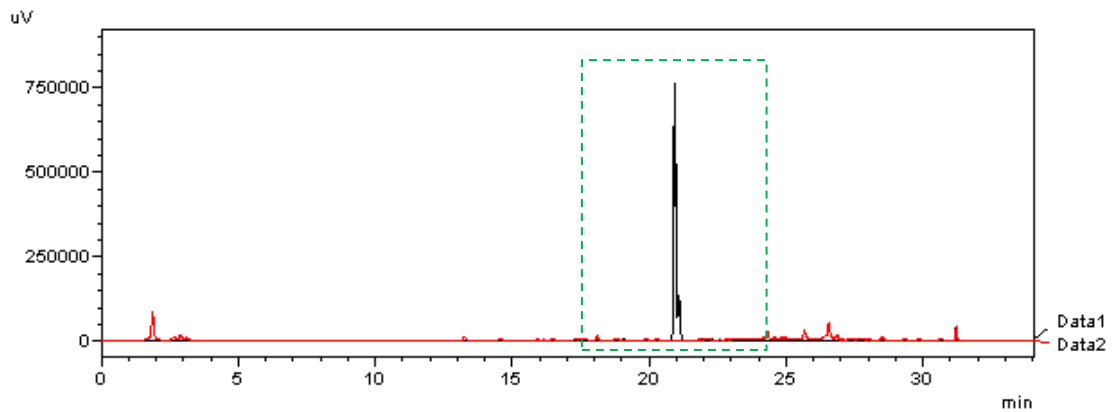


Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato do cultivo do fungo *Penicillium pinophilum* e da solução padrão de Lovastatina (forma lactona) 50 µg/mL

Padrão Lovastatina – Preto

Tempo de retenção (min) forma lactona: **20.93**

Extrato – Vermelho

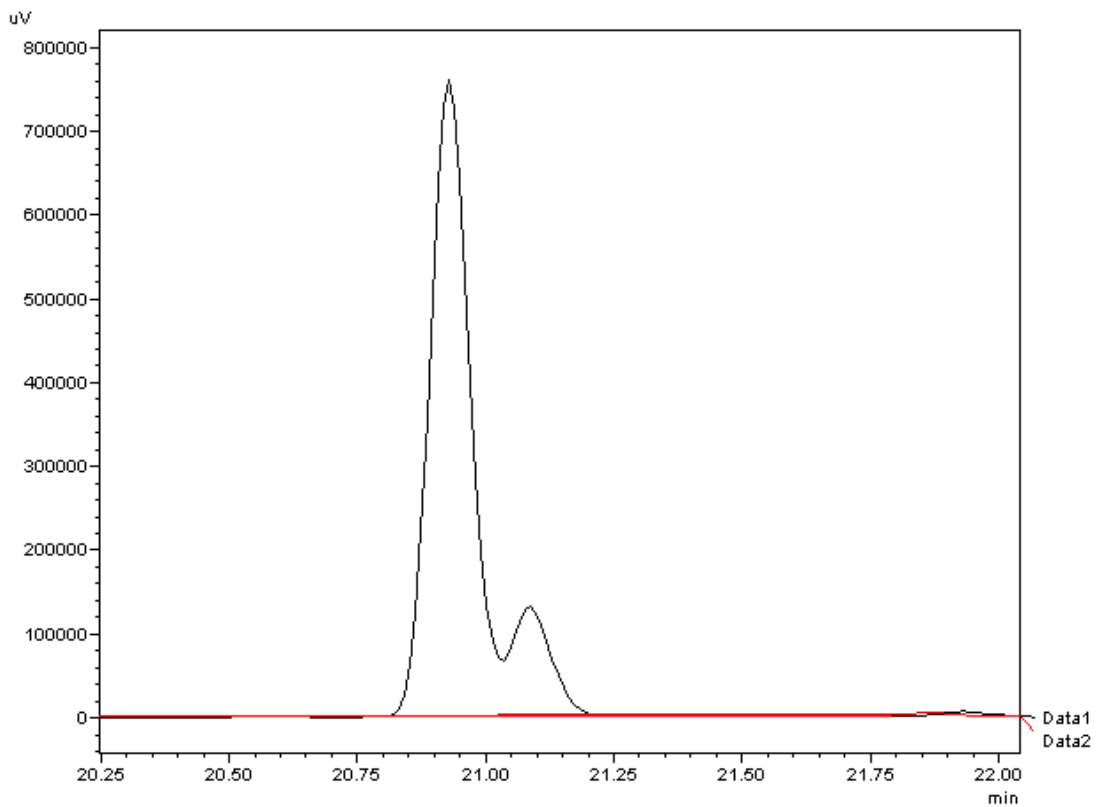
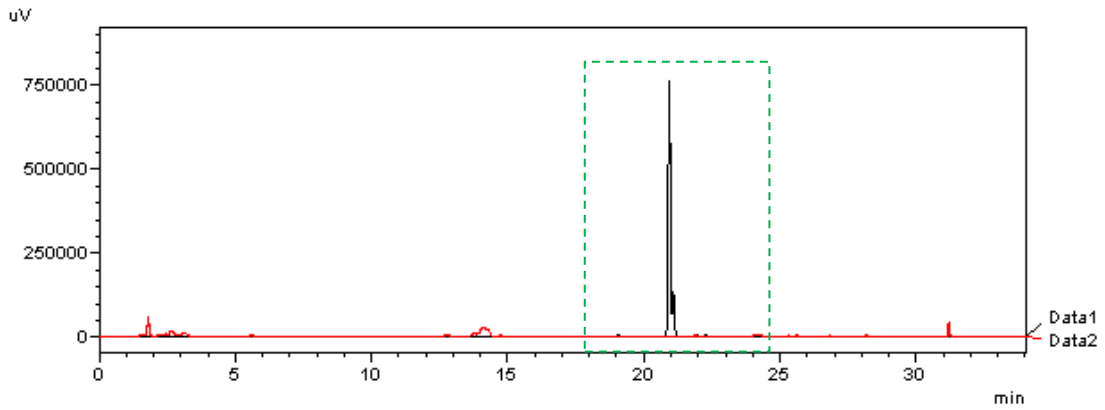


Comparação dos cromatogramas (238nm) do extrato de farelo de trigo e da solução padrão de Lovastatina (forma lactona) 50 µg/mL

Padrão Lovastatina – Preto

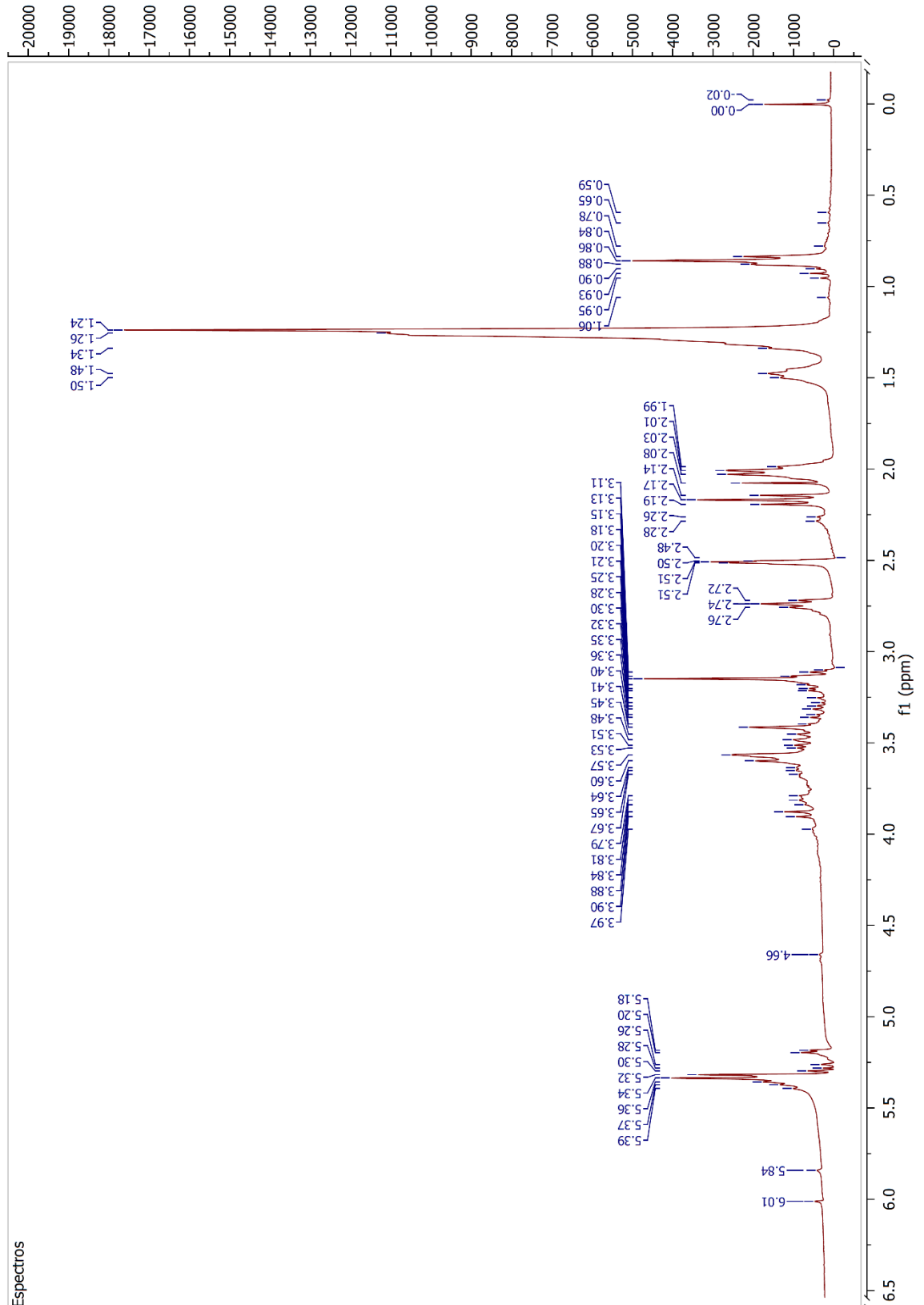
Tempo de retenção (min) forma lactona: **20.93**

Extrato – Vermelho

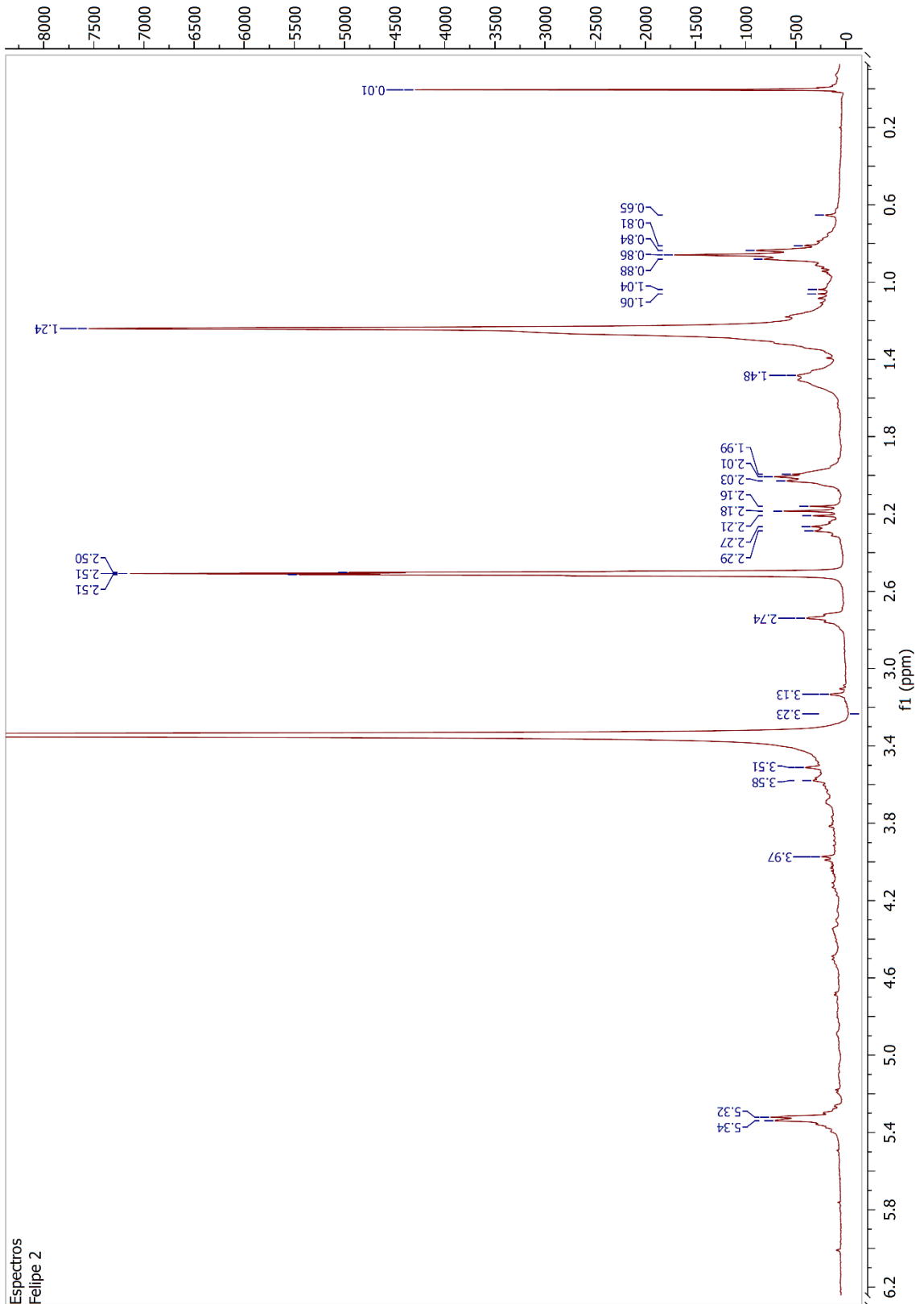


APÊNDICE E – Espectros de ressonância magnética nuclear das frações da ETAPA II

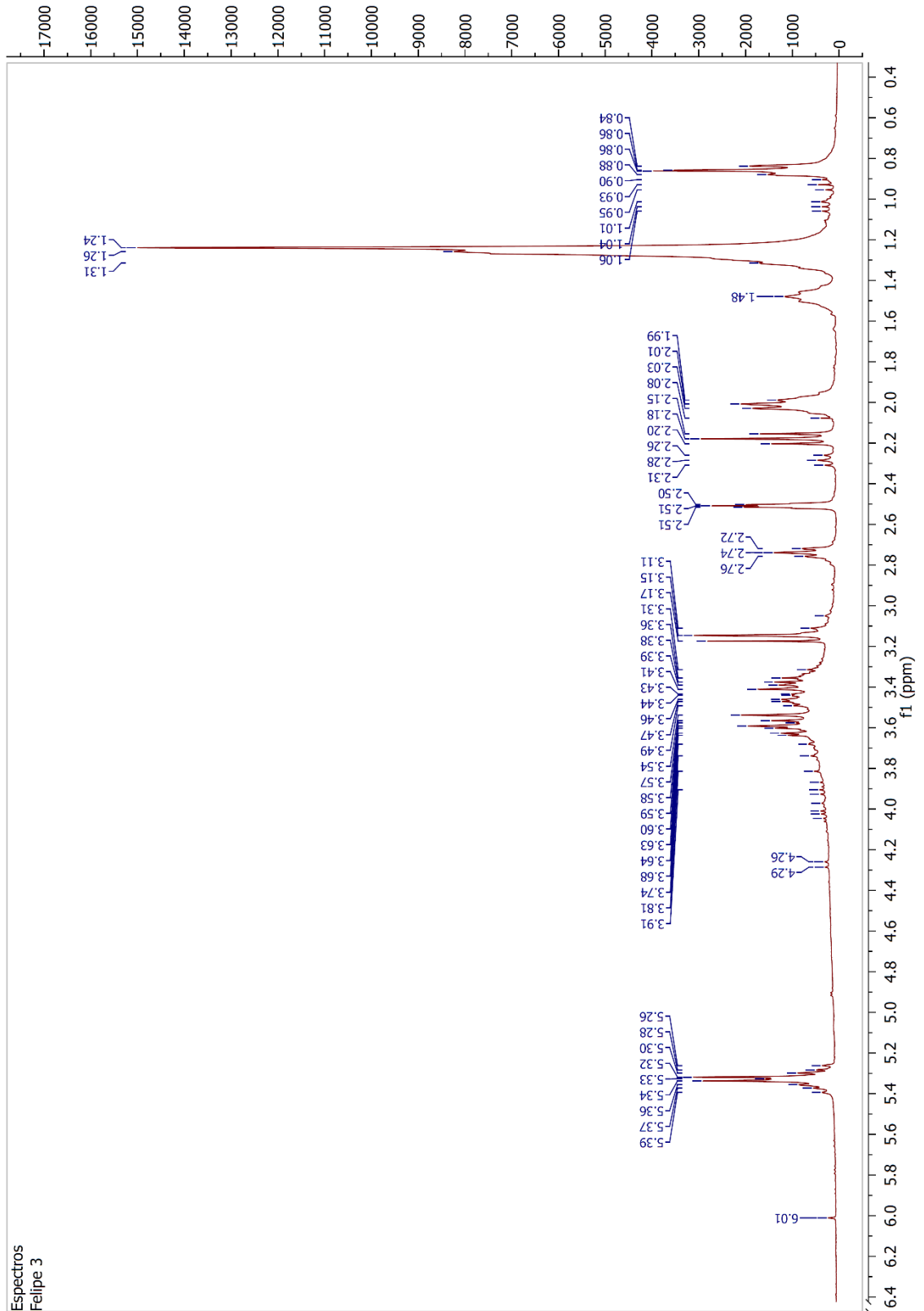
Espectro de ressonância magnética nuclear da **fração 1** (Extrato Farelo de trigo- Acetonitrila)



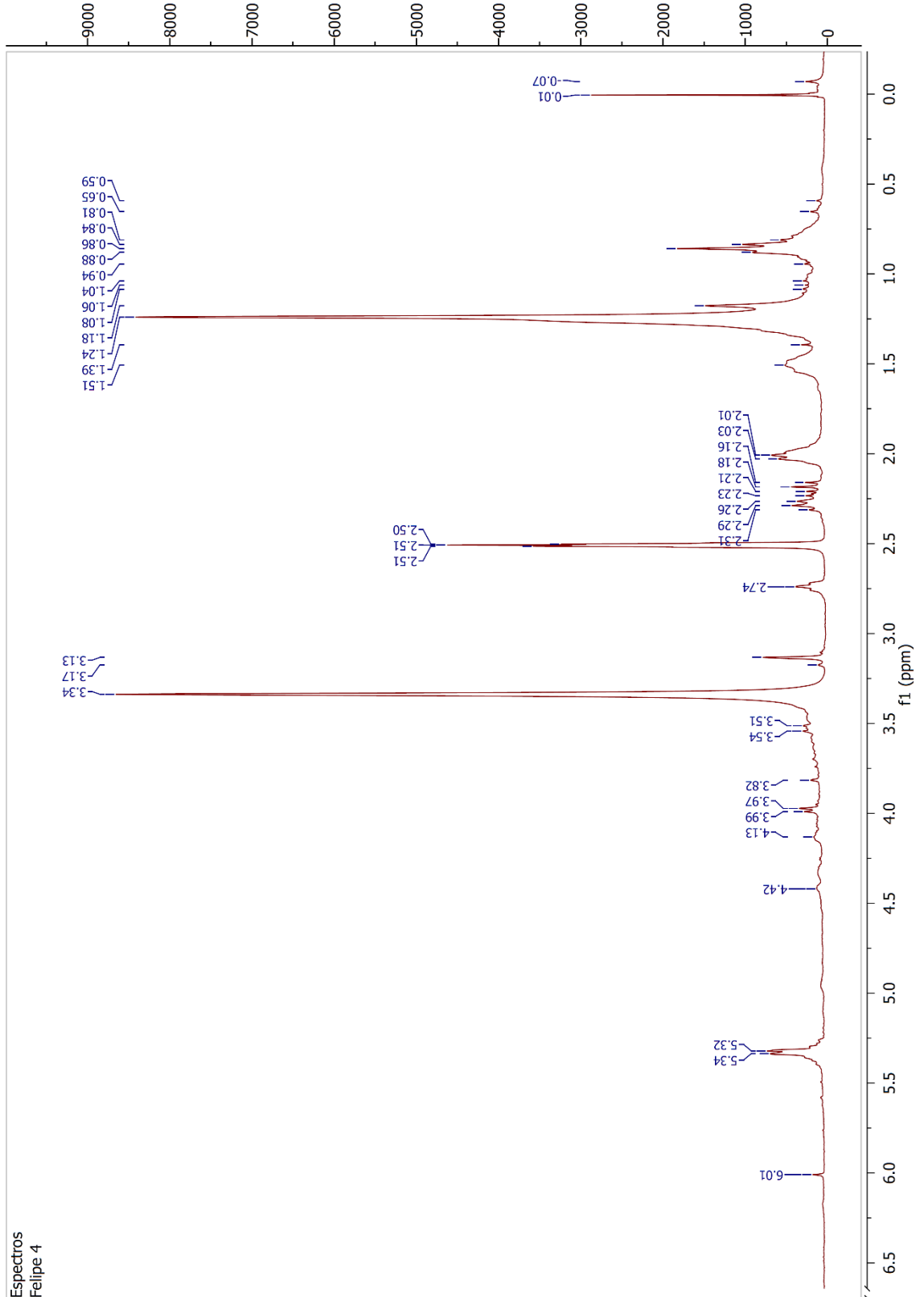
Espectro de ressonância magnética nuclear da **fração 2**
(Extrato Farelo de trigo- Acetato de etila)



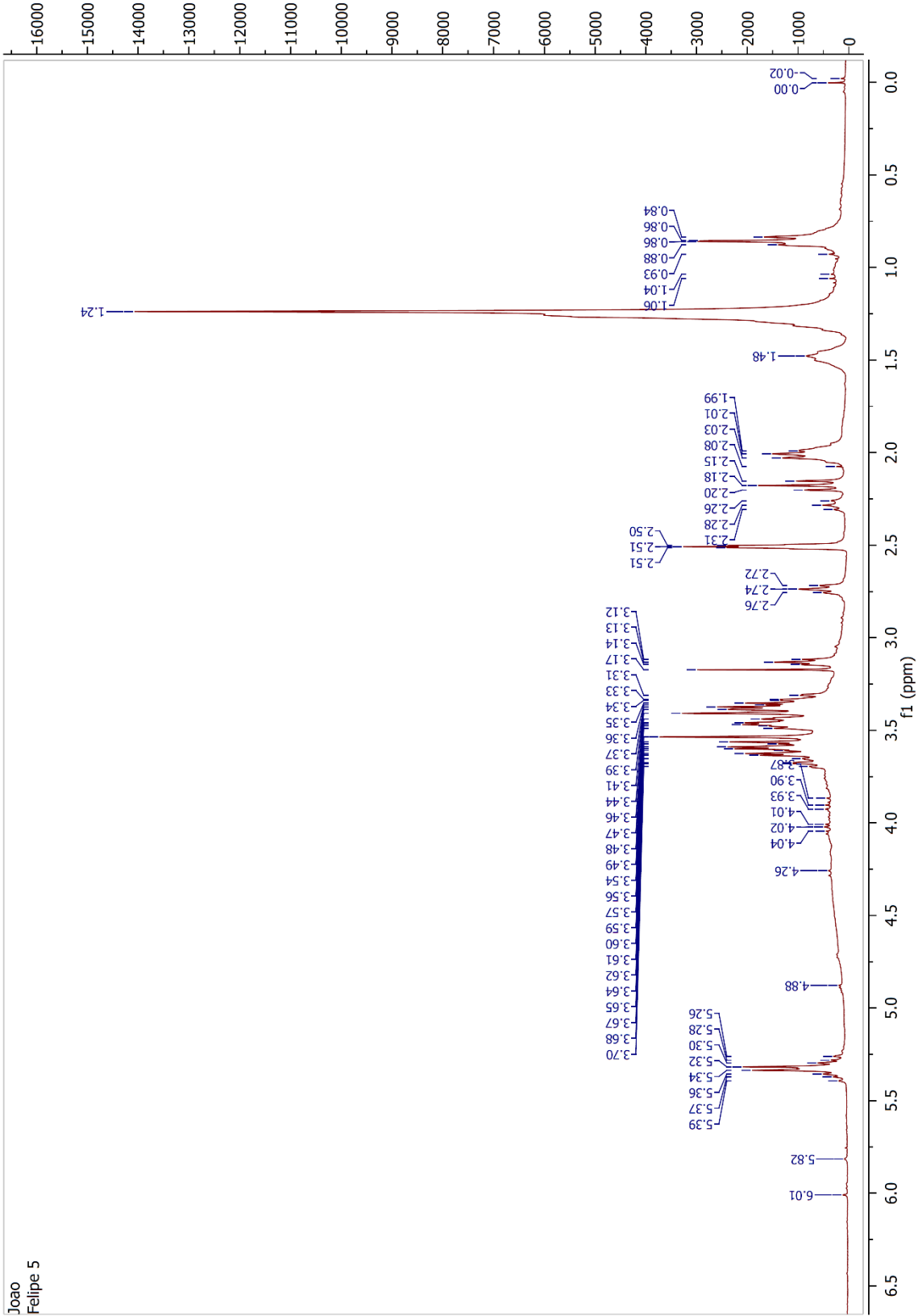
Espectro de ressonância magnética nuclear da **fração 3**
(Extrato cultivo *Trichoderma* sp. - Acetonitrila)



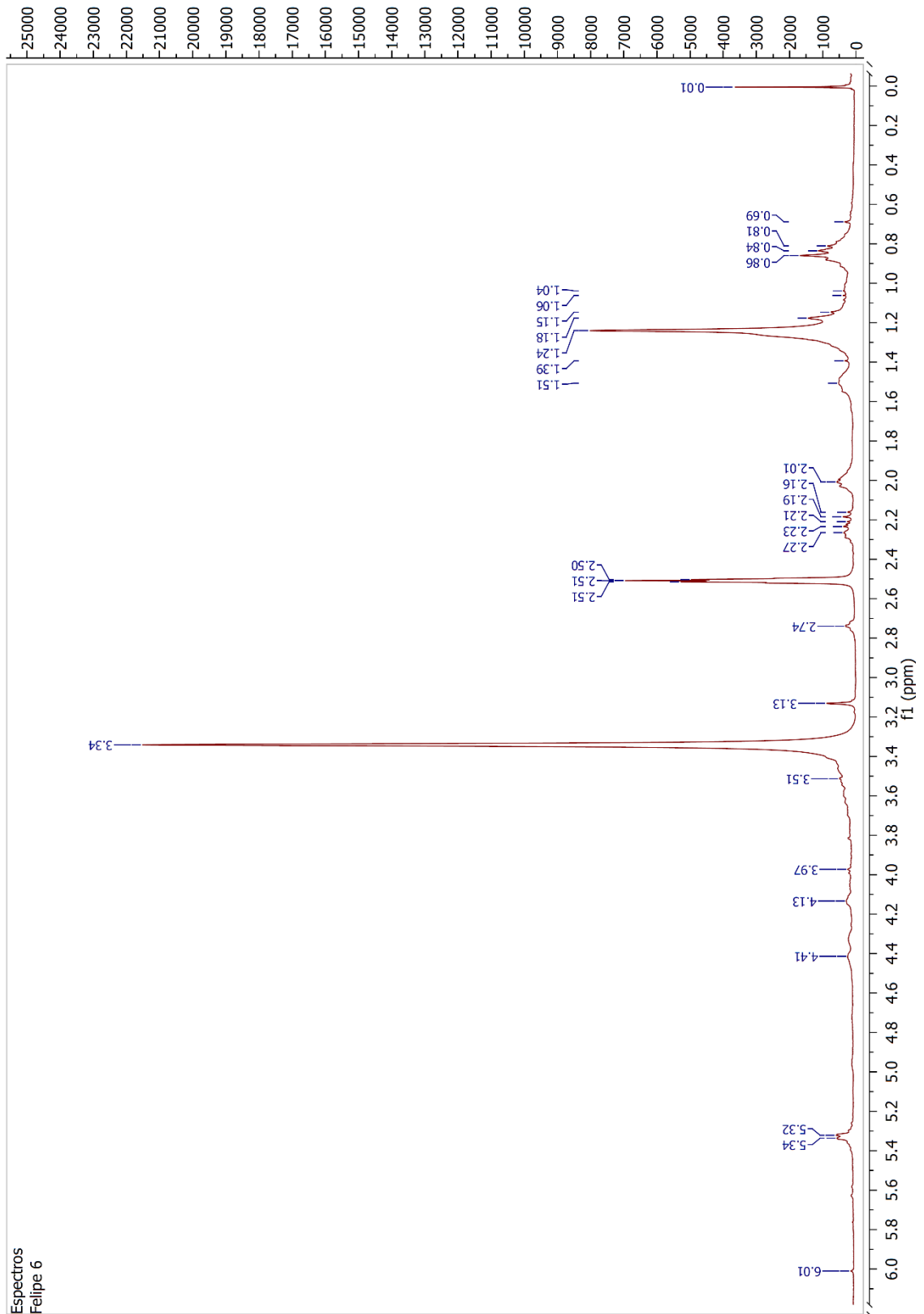
Espectro de ressonância magnética nuclear da **fração 4**
(Extrato cultivo *Trichoderma* sp. - Acetato de etila)



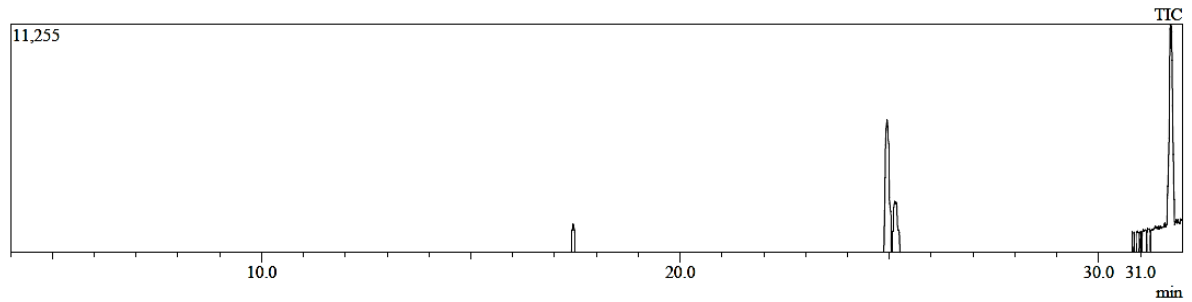
Espectro de ressonância magnética nuclear da **fração 5**
(Extrato cultivo *Penicillium pinophilum* - Acetonitrila)



Espectro de ressonância magnética nuclear da **fração 6**
(Extrato cultivado *Penicillium pinophilum* - Acetato de etila)



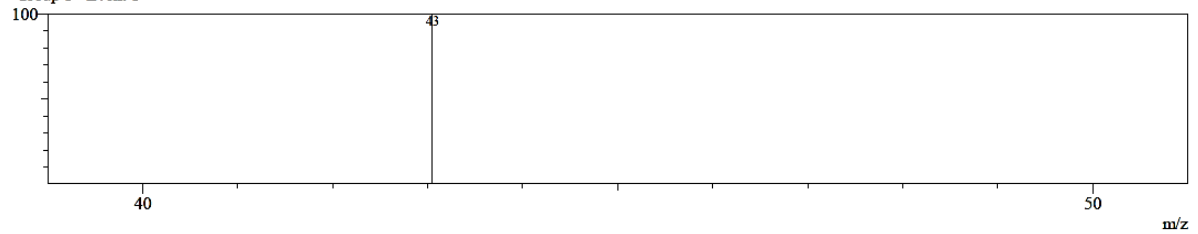
APÊNDICE F – Resultados CG/EM das frações da ETAPA II

CG/EM da **fração 1** (Extrato de farelo de trigo – Acetonitrila)

R.Time:17.425(Scan#:1612)

MassPeaks:1

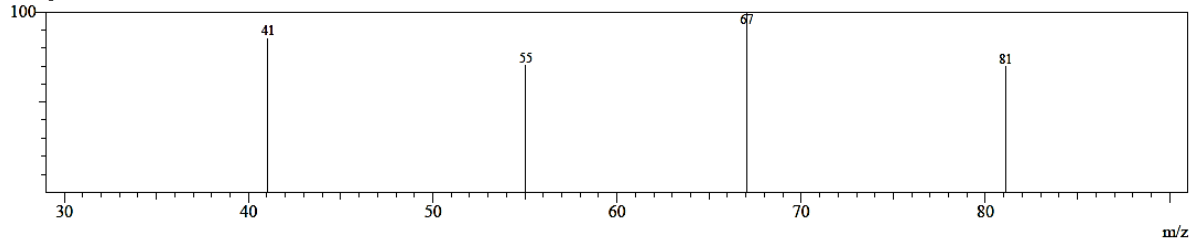
Group 1 - Event 1



R.Time:24.942(Scan#:2514)

MassPeaks:4

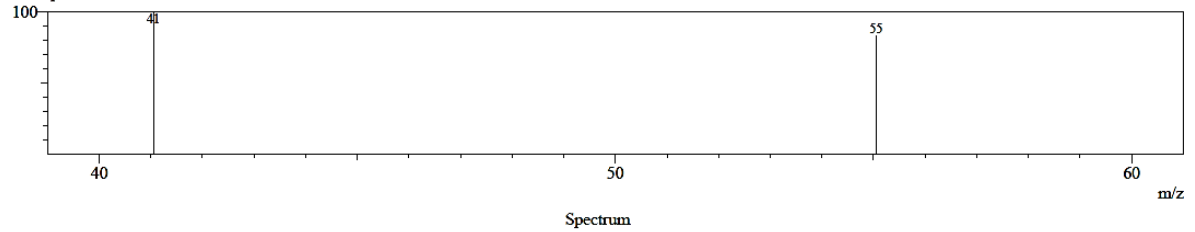
Group 1 - Event 1



R.Time:25.150(Scan#:2539)

MassPeaks:2

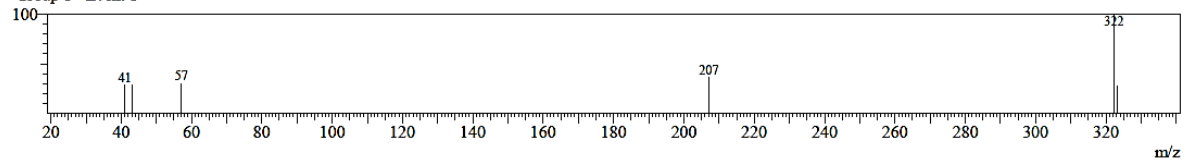
Group 1 - Event 1



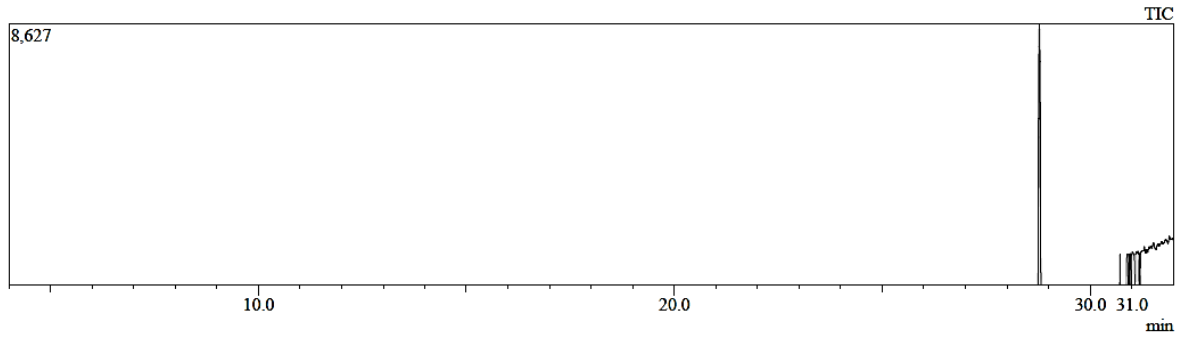
R.Time:31.733(Scan#:3329)

MassPeaks:6

Group 1 - Event 1

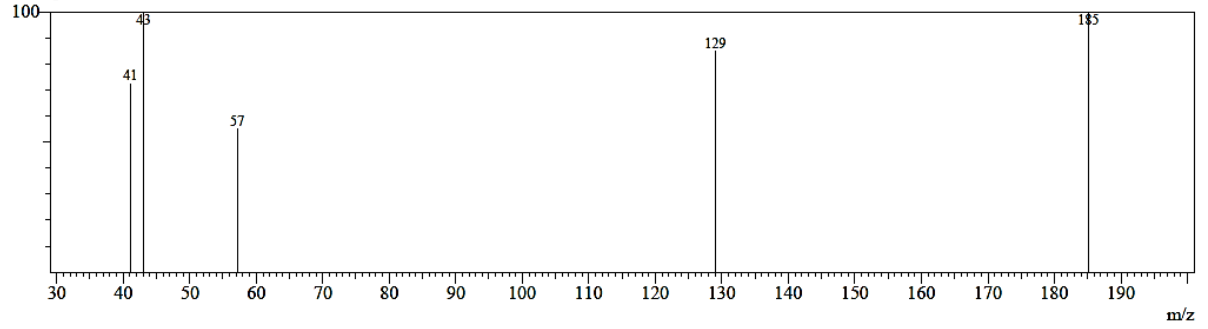


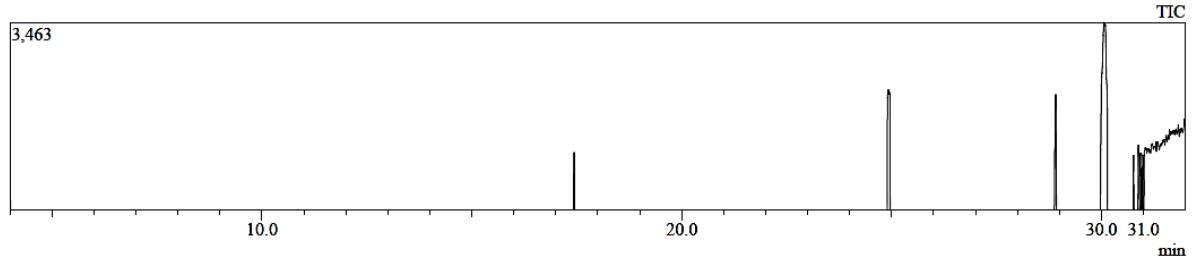
CG/EM da **fração 2** (Extrato de farelo de trigo – Acetato de etila)



Spectrum

R Time: 28.783 (Scan#: 2975)
Mass Peaks: 5
Group 1 - Event 1



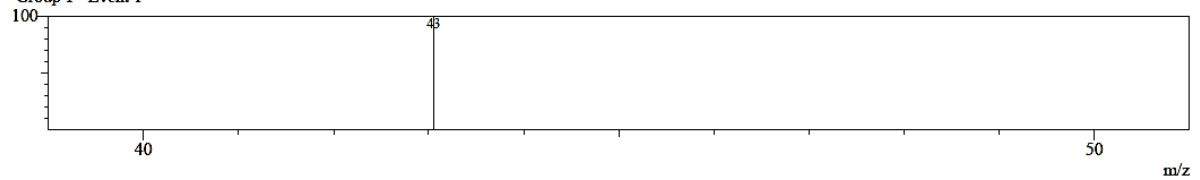
CG/EM da **fração 3** (Extrato do cultivo de *Trichoderma* sp. – Acetonitrila)

Spectrum

R Time:17.442(Scan#:1614)

MassPeaks:1

Group 1 - Event 1

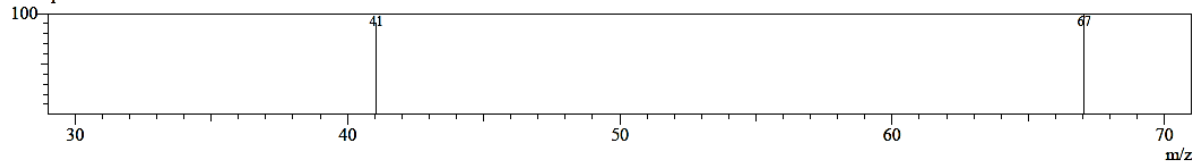


Spectrum

R Time:24.933(Scan#:2513)

MassPeaks:2

Group 1 - Event 1

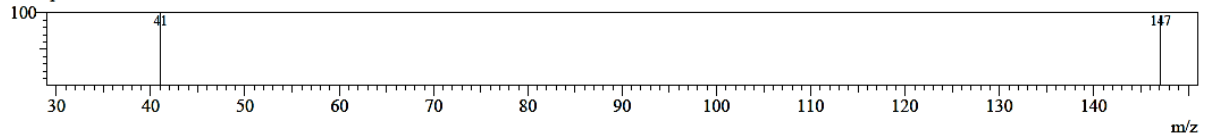


Spectrum

R Time:28.917(Scan#:2991)

MassPeaks:2

Group 1 - Event 1

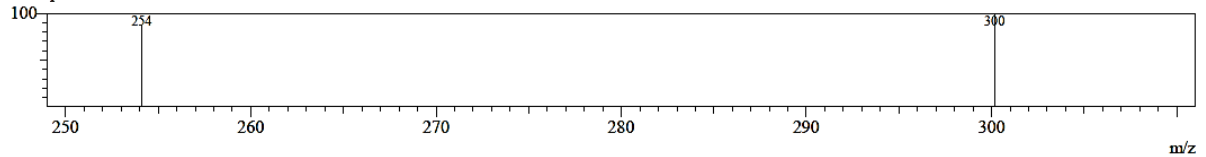


Spectrum

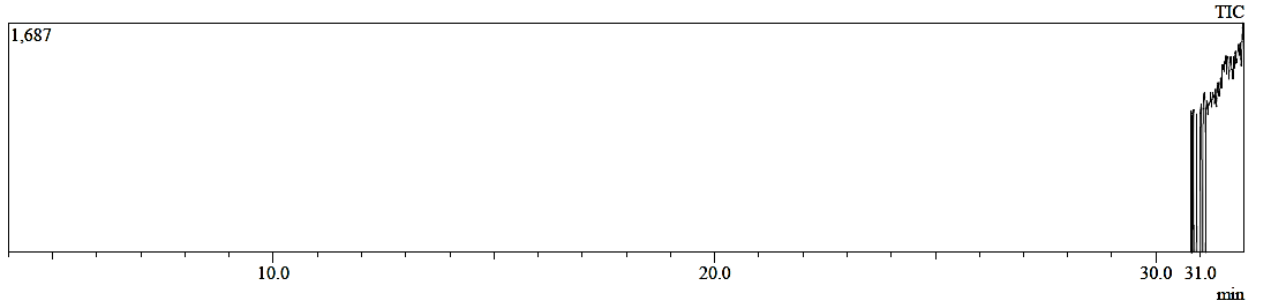
R Time:30.058(Scan#:3128)

MassPeaks:2

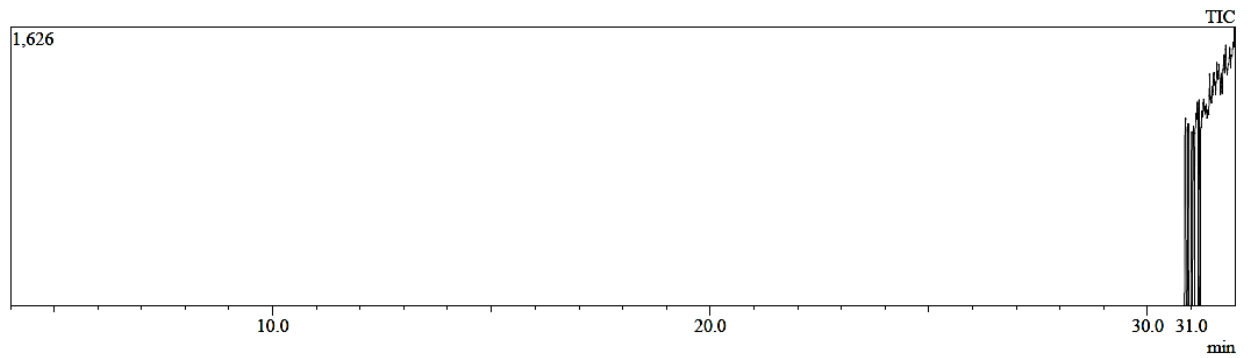
Group 1 - Event 1



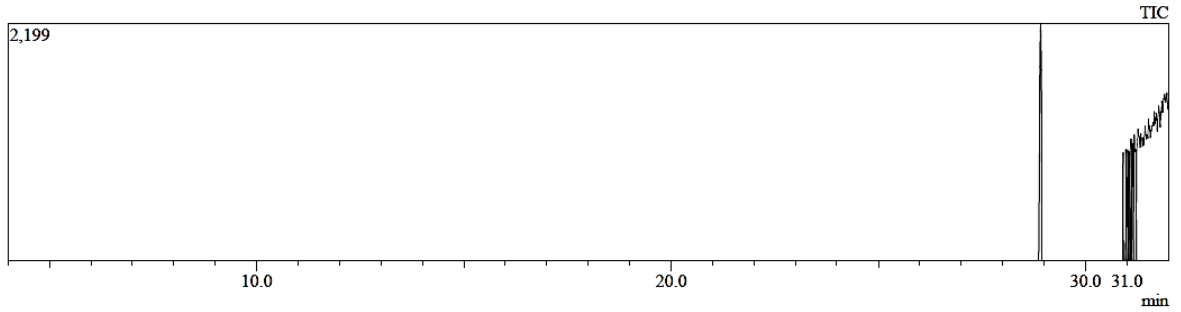
CG/EM da **fração 4** (Extrato do cultivo de *Trichoderma* sp. – Acetato de etila)



CG/EM da **fração 5** (Extrato do cultivo de *Penicillium pinophilum* sp. – Acetonitrila)



CG/EM da **fração 6** (Extrato do cultivo de *Penicillium pinophilum* sp. – Acetato de etila)



Spectrum

R.Time:28.908(Scan#:2990)
MassPeaks:1
Group 1 - Event 1

