UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos
produtores de compostos absorvedores de radiação UV para
aplicação em protetores solares**

Michelle de Andrade

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos
produtores de compostos absorvedores de radiação UV para
aplicação em protetores solares**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Michelle de Andrade

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira
Fonseca

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 07/04/2016. A versão original
encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP.**

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Andrade, Michelle de

Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos produtores de compostos absorvedores de radiação UV para aplicação em protetores solares. Ribeirão Preto, 2016.

79p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira

1. fotoproteção. 2. fungos filamentosos. 3. radiação UV.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michelle de Andrade

Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos produtores de compostos absorvedores de radiação UV para aplicação em protetores solares.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este mestrado aos meus pais
Vera e Paulo, a meu noivo Paulo Eduardo
e aos meus irmãos João Paulo e Robson,
pelo carinho e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que a cada dia de minha vida me concede ânimo para vencer os obstáculos.

Aos meus pais, Vera e Paulo, por estarem sempre a meu lado, pelo apoio constante e amor incondicional.

Ao meu noivo Paulo Eduardo pelo companheirismo e compreensão em todos os momentos.

Aos meus irmãos João Paulo e Robson, pela amizade, carinho e amor.

À minha orientadora, professora Dra. Maria José Vieira Fonseca, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo incentivo e confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora, professora Dra. Maria de Lourdes, pela influência na execução do trabalho, por fornecer as cepas fúngicas para que este estudo fosse realizado.

Em especial à minha amiga Dayane Moraes, pela amizade, apoio e auxílio na realização deste trabalho.

Aos professores Priscyla Marcato e Fernando Batista, pelos conhecimentos transmitidos e por disponibilizarem alguns equipamentos essenciais para a realização deste trabalho.

Aos técnicos Mário, Angélica, Luizão, Mariana, Senzi, Eduardo e Aninha pelo auxílio na utilização de equipamentos e realização de experimentos, e em especial a José Roberto Jabor, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração.

Às amigas de laboratório Dayane, Soninha e Aninha, pela amizade, sinceridade, companheirismo, incentivo e risadas. E às colegas Rebeca, Karini, Geórgia pelo convívio e cooperação.

Aos colegas do laboratório de microbiologia e biologia celular, Mônica, Rose, Ana Vici, Ana Silvia e Enrico pela valiosa contribuição neste trabalho, em especial à Luciana Ziotti, pela identificação das cepas fúngicas.

Aos colegas do laboratório de farmacognosia, Bruno, Marivane, Mariza, Tatiane, Jonas, Marcela, Gari, e Juliana pela atenção, convívio e amizade, em especial ao Federico Padilla, pela realização da análise cromatográfica da amostra.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana Florêncio pela atenção e dedicação nos serviços prestados.

À todos os funcionários da FCFRP, pelo auxílio, gestos de carinho e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido.

À todos que participaram e contribuíram de alguma forma para mais esta conquista.

Muito obrigada!

“Pensamos demasiadamente e sentimos muito pouco. Necessitamos mais de humildade que de máquinas. Mais de bondade e ternura que de inteligência. Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá”.

Charles Chaplin.

RESUMO

ANDRADE, M. **Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos produtores de compostos absorvedores de radiação UV para aplicação em protetores solares.** 2016. 79f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2016.

Foram estudadas trinta e uma cepas fúngicas não identificadas, as quais foram denominadas X1 a X31. O potencial fotoprotetor foi avaliado pela medida espectrofotométrica da absorção dos extratos na região do UV (280-400 nm). Os extratos com os melhores perfis de absorção em cultura estacionária foram X1, X2, X6, X12, X13, X18, X19, X22, X24 e X31 e, em cultura agitada X4 e X17. A reprodutibilidade do processo foi avaliada e as cepas fúngicas que apresentaram coeficiente de variação menor que 15% foram selecionadas para o estudo de fotoestabilidade. A fotoestabilidade dos extratos foi avaliada pela medida da viabilidade celular de fibroblastos L929 tratados com extratos previamente irradiados sob radiação UVA (11,2 J/cm²) e UVB (3,43 J/cm²) e extratos não irradiados, bem como, pela comparação das áreas sob as curvas de absorção na região do UV dos extratos irradiados e não irradiados. Os extratos selecionados para o estudo de fotoestabilidade foram X4, X12, X19, X22, X24 e X31. Os extratos não irradiados apresentaram os seguintes valores de IC₅₀ para viabilidade celular (citotoxicidade): X4-130µg/ml, X19-20µg/ml, X22-10 µg/ml e X24-60µg/ml. Após a radiação UVA e UVB, os extratos apresentaram redução significativa da viabilidade celular em relação ao IC₅₀ dos extratos não irradiados. Sob luz UVB, os extratos X12 (IC₅₀ 35µg/ml) e X31 (IC₅₀ 70µg/ml) mantiveram a mesma porcentagem de redução da viabilidade celular quando comparado ao IC₅₀ dos extratos não irradiados. No entanto após exposição à luz UVA, o extrato X12 aumentou a viabilidade celular de 50% (quando não irradiado) para 75% (irradiado). Enquanto que o extrato X31, mesmo após a radiação UVA, manteve a mesma redução de 50% da viabilidade celular. Nessa etapa os extratos selecionados foram os X12 e X31. O espectro de absorção na região do UV obtido para o extrato X12 mostrou uma redução da absorbância de 28,3% sob radiação UVB e de 60% sob radiação UVA em relação ao extrato não irradiado. O extrato X31 apresentou uma redução da absorbância de 17,6% e 30% sob radiação UVB e UVA respectivamente, em relação ao extrato não irradiado. Os fungos selecionados foram identificados por PCR, sugerindo que o fungo X12 seja o *Aspergillus terreus* e o X31 seja o *Talaromyces pinophilus*. Por fim, foi feita a identificação da substância ativa do extrato X12 empregando a técnica de desreplicação, a qual fez o uso da instrumentação analítica acoplada UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS associada ao banco de dados Chapman & Hall's Dictionary of Natural Products (DNP). No extrato X12 o composto majoritário foi identificado como sendo a citreoviridina. Assim, os resultados do presente trabalho permitiu estabelecer um procedimento para a seleção de fungos produtores de compostos absorvedores de radiação UV, que poderia ser aplicado na obtenção de novos filtros orgânicos naturais para protetores solares.

Palavras-chave: fotoproteção, fungos filamentosos, radiação UV.

ABSTRACT

ANDRADE, M. **Simple and fast method for selection of filamentous fungi producers of UV absorbing compounds for use in sunscreens**. 2016. 79p. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, 2016.

It were studied thirty-one fungal strains not identified, which were named X1 to X31. The photoprotective potential was assessed spectrophotometrically by measuring absorption of the extract in the UV region (280-400 nm). The extracts that presented the best absorption profiles in stationary culture were X1, X2, X6, X12, X13, X18, X19, X22, X24 and X31, and X4 and X17 in stirred culture. The reproducibility of the process was evaluated and fungal strains that showed a coefficient of variation lower than 15% were selected for the study of photostability. The photostability of the extracts was assessed by measuring cell viability of L929 fibroblasts treated with extracts previously irradiated under UVA light (11,2 J/cm²) and UVB (3,43 J/cm²) and not irradiated extracts, as well as by comparison of the areas under the curves of absorption in the UV region of the irradiated and non-irradiated extracts. The extracts selected for the study of photostability were X4, X12, X19, X22, X24 and X31. The non-irradiated extracts showed the following IC₅₀ values for cell viability (cytotoxicity): X4-130µg/ml X19-20µg/ml, X22-10/ml and X24-60µg/ml. After UVA and UVB radiation, the extracts showed significant reduction in cell viability compared to the IC₅₀ of the unirradiated extracts. Under UVB light, the X12 extracts (IC₅₀ 35µg/ml) and X31 (IC₅₀ 70mg/ml) maintained the same percentage of cell viability reduction when compared to the IC₅₀ of the unirradiated extracts. However after exposure to UVA light, X12 extract increased the cell viability from 50% (when not irradiated) to 75% (irradiated). While X31 extract even after the UVA irradiation, remained the same 50% of reduction in cell viability. At this stage the selected extracts were X12 and X31. The absorption spectrum in the UV region obtained for X12 extract showed a decrease in absorbance of 28.3% under UVB and 60% under UVA radiation relative to non-irradiated extract. The X31 extract showed a reduction in absorbance of 17.6% and 30% in UVA and UVB radiation, respectively, compared to non-irradiated extract. The selected fungi were identified by PCR, suggesting that X12 fungus is *Aspergillus terreus* and X31 is the *Talaromyces pinophilus*. Finally it was identified the active substance of X12 extract employing dereplication technique which makes use of coupled analytical instrumentation UHPLC-DAD- (ESI) HRMS associated to the Chapman and Hall's Dictionary of Natural Products (DNP) database. The majority compound of X12 extract was identified as the citreoviridin. Thus, the results of this study allowed us to establish a procedure for the selection of producers of UV absorbing compounds from fungi, which could be applied in obtaining new natural organic filters for sunscreens.

Keywords: photoprotection, filamentous fungi, UV radiation.

LISTA DE LEGENDAS

Figura I. Exemplos de alguns compostos farmacologicamente importantes derivados de fungos	10
Figura II. Esquema de preparação do inóculo	19
Figura III. Esquema da obtenção do extrato fúngico, análise espectrofotométrica.....	19
Figura IV. Esquema do método de determinação da fotoestabilidade dos extratos.....	21
Figura V. Características das colônias fúngicas estudadas e os espectros de absorção na região do UV obtidos pelos seus compostos extracelulares	29-34
Figura VI. Perfis de absorção obtidos em dias diferentes, dos extratos orgânicos extraídos das culturas dos fungos.....	35-36
Figura VII. Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) dos extratos orgânicos irradiados e não irradiados.....	38
Figura VIII. Espectro de absorção na região UV (280-400nm) do extratos X12 e X31 não irradiado e irradiado com luz UVA e UVB.....	41
Figura IX. Sequência dos primers universais utilizados em PCR.(WHITE et al.;1990)	42
Figura X. Eletroforese em gel de agarose	43
Figura XI. Cromatografia de íons totais (TIC) no modo positivo (A) e negativo (B) do extrato X12	45
Figura XII. Cromatograma com detector de UV nos canais A,B e C do extrato X12.....	46
Figura XIII. Espectros de massas em modo positivo (A) e modo negativo (B) do extrato X12	47
Figura XIV. Cromatograma ampliado dos picos que coeluem no TR 13'-16' do extrato X12	49
Figura XV. Estrutura química dos isômeros Citroviridina A e Citreoviridina C.....	49
Figura XVI. Espectro UV da citreoviridina relatado por Sakabe et al.1997.....	50
Figura XVII. Espectro UV obtido pela amostra X12.....	50

LISTA DE LEGENDAS

Tablea I. Diferentes tipos de produtos industrialmente importantes obtido de fungos filamentosos (Adaptado de EL-ENSHASY, 2007)	12
Tabela II. Composição do meio mínimo	18
Tabela III. Composição do meio SR	23
Tabela IV. Valores das áreas sob as curvas de absorção e os correspondentes coeficientes de variação provenientes das culturas dos fungos	36
Tabela V. Valores de IC50 obtidos para a viabilidade celular em linhagem L929 para os extratos fúngicos não irradiados	39
Tabela VI. Resultado da identificação do fungo X12	43
Tabela VII. Resultado da identificação do fungo X31	43
Tabela VIII. Critérios de busca e resultados do Dictionary of Natural Products.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Ativador proteína-1
BMDM	Butil metoxidibenzoilmetano
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₂ .5 H ₂ O	Cloreto de Cobalto pentahidratado
CV	Coefficiente de variação
dATP	Desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	Desoxicitidina trifosfatada
dGTP	Desoxiguanosina trifosfatada
dTTP	Desoxitimidina trifosfatada
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
DNP	Dictionary of Natural Products
DPCs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FFLC/RP	Faculdade de filosofia letras e ciências de Ribeirão Preto
HESI	Heated Electrospray
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

H_3BO_3	Ácido bórico
$\text{HO}^\bullet$	Radical hidroxila
IC_{50}	Concentração que inibe 50%
ICH	International conference on harmonisation
I – KB	Proteína inibidora Kappa B
ITS	Internal transcribed Spacer
J/cm^2	Joules por centímetros quadrado
JNK	Quinase <i>c-Jun</i> amino-terminal
KCL	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MgCl_2	Cloreto de magnésio
MgSO_4	Sulfato de magnésio
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de manganês tetrahidratado
MMP	Metaloproteinase
MRFA	Acetato de <i>L</i> -metionil-arginil-fenilalanina
m/z	Massa/carga
N_2	Nitrogênio
Na_2EDTA	Disodium ethylenediamine tetraacetic acid
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de Sódio tetrahidratado
Na_2NO_3	Nitrato de sódio
NCBI	Centro Nacional de Informações em biotecnologia
NF-KB	Fator nuclear - Kappa B
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Fosfato de amônio monobásico
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ânion Superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete

pb	Pares de Bases
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDA	Ágar batata dextrose
RNase	Ribonuclease
RUV	Radiação Ultravioleta
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
6-4 PPs	6-4 Pirimidina- Pirimidona
TIC	Cromatografia de íons totais
TR	Tempo de retenção
TiO ₂	Dióxido de titânio
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
ZnO	Óxido de zinco
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Radiação Ultravioleta e Seus Efeitos Sobre a Pele	6
2.2 Uso de Protetores Solares	8
2.3 Fungos	9
2.4 Fungos filamentosos	11
2.5 Estratégias de defesa dos micro-organismos contra a radiação UV	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Obtenção das Cepas Fúngicas	17
4.2 Repique das Cepas	17
4.3 Meio de cultivo	17
4.3.1 Meio líquido	17
4.4 Suspensão de conídios	18
4.5 Preparação do inóculo	18
4.6 Obtenção dos extratos	19
4.7 Espectros de absorção dos extratos orgânicos	20
4.8 Avaliação da reprodutibilidade do processo de obtenção dos metabólitos fúngicos	20
4.9 Avaliação da fotoestabilidade do extrato orgânico selecionado sob radiação UVA e UVB	20
4.10 Determinação da viabilidade celular das células de fibroblastos L929 expostas às soluções do extrato irradiado e não irradiado	21
4.10.1 Preparo das amostras dos extratos irradiados e não irradiados	21

4.10.2 Medida da viabilidade celular pelo vermelho neutro	21
4.11 Comparação dos espectros de absorção dos extratos irradiados e não irradiados	22
4.12 Identificação molecular das cepas fungicas selecionadas	22
4.12.1 Crescimento do fungo e Extração de DNA	22
4.12.2 Amplificação através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	23
4.13 Identificação da substancia ativa do extrato X12	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Extração dos compostos que absorvem a radiação da região do UVA e UVB	27
5.2 Avaliação da reprodutibilidade do processo de obtenção dos metabólitos fúngicos	34
5.3 Avaliação da fotoestabilidade do extrato orgânico selecionado sob radiação UVA e UVB	37
5.3.1 Citotoxicidade em cultura de células da linhagem L929	37
5.3.2 Comparação dos espectros de absorção dos extratos irradiados e não irradiados	40
5.4 Identificação molecular do fungos selecionados	41
5.5 Identificação da substância ativa	44
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS	53

1 Introdução

A radiação solar ultravioleta (UV) é dividida em UVA-I (340-400 nm), UVA-II (320-340nm), UVB (290-320nm) e UVC (200-290 nm) (GASPARRO; MITCHNIK; NASH, 1998). A maior parte da radiação UVC é absorvida pela camada de ozônio, portanto, as radiações de interesse para a saúde humana consistem dos raios UVA e UVB.

O principal mecanismo pelo qual a radiação UVA causa danos à pele é via formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs modificam drasticamente a função celular pela oxidação dos lipídeos das membranas biológicas alterando a fluidez e diminuindo a eficiência do transporte nuclear e mitocondrial, favorecendo o fotoenvelhecimento cutâneo, a imunossupressão, bem como, a patogênese do melanoma (CHEN; HU; WANG, 2012).

A radiação UVB é mais genotóxica e mais eficiente em causar queimadura solar do que a radiação UVA. Os efeitos biológicos adversos proporcionados pelos raios UVB são mais complexos, pois atuam por mecanismos diretos e indiretos, causando distorções na estrutura da dupla hélice do DNA por meio da formação de dímeros de pirimidina, como também é capaz de gerar EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), as quais por mecanismos indiretos podem causar danos às estruturas celulares, tais como, membranas plasmáticas, lipídeos e ácidos nucleicos, desempenhando um papel importante na promoção do tumor (JIANG et al., 2006; NAYLOR, WATSON, SHERRATT, 2011).

Estudos recentes demonstram que a maioria dos filtros solares atualmente disponíveis, tanto orgânicos quanto inorgânicos, apresentam sérios problemas de fotoestabilidade, levando à redução de sua eficácia e segurança. De fato dados recentes demonstraram que na presença de radiação UV tanto dióxido de titânio (TiO_2) quanto óxido de zinco (ZnO), os filtros inorgânicos mais amplamente utilizados, apresentam marcante atividade fotocatalítica, o que leva à produção de EROs. Tal atividade é um fato intrigante, uma vez que a fotoestabilidade é um pré-requisito essencial para garantir a eficácia e segurança do filtro solar (FUJISHIMA; RAO; TRYK, 2000; JING et al., 2001; GURR et al., 2005; RAMPAUL; PARKING; CRAMER, 2007). Estudos conduzidos por Hanson, Gratton e Bardeen (2006) mostram que quando os filtros solares orgânicos penetram nas camadas nucleadas da pele, o nível de EROs aumenta além daquele produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob RUV.

Estas inconsistências acerca da efetividade dos filtros solares estimulam pesquisas em busca de substâncias mais eficazes e seguras contra a RUV, capazes de absorver o amplo espectro da radiação UVB, UVA-I e UVA-II (COUTEAU et al., 2007).

Neste sentido, os extratos naturais são importantes fontes de novos compostos bioativos. Apesar do declínio nas pesquisas envolvendo produtos naturais para a descoberta de novas moléculas com atividade biológica por parte das indústrias, produtos derivados de

fontes naturais ainda contabilizam receitas significativas para muitas das principais companhias farmacêuticas e cosméticas (BAKER, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2012).

A natureza é um grande reservatório de organismos que produzem compostos benéficos à saúde (ZHU et al., 2011). Nos últimos 25 anos, 48% dos 1200 novos fármacos comercializados foram obtidos de organismos vivos, como fungos, bactérias, plantas e animais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Os extratos naturais, de plantas e micro-organismos, são altamente complexos devido à presença concomitante de metabólitos com alta diversidade química. O termo “metabólito” é muito difundido e refere-se a compostos de baixa massa molecular (> 1000 Da) que são essenciais à manutenção da vida de um dado organismo via processos metabólicos normais (metabólitos primários) ou não essenciais, mas necessários para sobrevivência em um dado ambiente (metabólitos secundários). Os metabólitos primários incluem aminoácidos, lipídeos e carboidratos e os secundários estão relacionados aos mecanismos de defesa e de sinalização celular e incluem polifenóis, alcaloides, terpenos, poliquetídeo e hormônios (LARSSON et al., 2005; GROTEWOLD, 2005).

Dentre as fontes de extratos naturais ricas em compostos bioativos, os micro-organismos são candidatos mais promissores à produção de novos fármacos e substâncias de interesse à saúde humana (DEMAIN, 2014). Trinta e três por cento de todos os produtos naturais anticâncer aprovados pela FDA (US Food and Drug Administration) foram de origem microbiana ou derivada do metabolismo microbiano (GIDDINGS; NEWMAN, 2013). Os micro-organismos são fonte atrativa de bioativos devido à sua ocorrência em uma diversidade de ambientes (solo, água, ar, plantas, animais e etc), às suas interações microbianas ubíquas, sua grande biodiversidade e a quimiodiversidade de compostos sintetizados por algumas espécies (AKONDI; LAKSHMI, 2013). Outro fator chave que faz com que os micro-organismos sejam importantes fontes de novos fármacos é a facilidade de cultivo em laboratório, assim, a produção do bioativo pode ser otimizada e escalonada quando requerida.

A capacidade dos fungos de produzir substâncias que absorvem a radiação UV, associado à necessidade do mercado de novos filtros orgânicos mais eficazes, seguros, que cobrem em maior extensão a faixa do UVA, principalmente a faixa do UVA-I e que sejam capazes de melhorar o sensorial dos protetores solares tem despertado o interesse comercial por estes micro-organismos como possíveis fornecedores alternativos de novos filtros orgânicos.

Assim, devido à grande produção de metabólitos ativos e pela facilidade dos fungos filamentosos crescerem em substratos simples e de baixo custo, estes têm despertado interesse

biotecnológico (MEYER, 2008). Entretanto, ainda são escassos os trabalhos de pesquisa que avaliam o potencial dos fungos filamentosos na produção de substâncias com alta capacidade absorvedora da radiação solar, principalmente, a radiação UVA-I e UVA-II visando a sua aplicação comercial em protetores solares.

2 Referencial Teórico

2.1 Radiação Ultravioleta e Seus Efeitos Sobre a Pele

A radiação ultravioleta (UV) emitida pela luz do sol compreende a faixa do espectro eletromagnético situada entre 100 e 400 nm, e é dividida em três regiões de acordo com o comprimento de onda: UVC (100-290 nm); UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm), cada qual com o seu potencial de penetração cutânea (GRUIJL; VAN KRANER; MULLENDERS, 2001). A luz UVC apresenta a maior energia e elevada capacidade mutagênica, porém não consiste em sério risco à saúde humana, uma vez que é totalmente absorvida pelo ozônio atmosférico, sendo assim, não atinge a superfície terrestre (BALOGHI et al., 2011; KOSTOVA, 2008).

Os raios UVB equivalem a 5% da luz UV solar total, sendo capaz de transpor toda a extensão da epiderme, podendo atingir parcialmente a derme (NICHOLS; KATIYAR, 2010). É considerada essencial para a conversão do ergosterol em vitamina D, bem como, a principal responsável por causar bronzeamento, eritema solar (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005) e, por uma série de patologias cutâneas, incluindo o melanoma cutâneo não-neoplásico e doenças pré-neoplásicas (COUTAU et al., 2007).

A radiação UVB atua fundamentalmente por meio de mecanismos diretos de lesão ao DNA, o qual ao absorver fótons de energia com comprimentos de onda menores, referentes à banda UVB, origina imediatamente uma série de reações de dimerização entre bases de pirimidina adjacentes (SAMBANDAN; RATNER, 2011), levando à formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (DPCs) e (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Estes fotoprodutos, a nível molecular, parecem ser responsáveis por distorções significativas na dupla fita do DNA, interferindo nos mecanismos celulares, que em conjunto, induzem múltiplos efeitos sobre o sistema imunológico, desempenhando um papel importante na geração e manutenção da carcinogênese (AFAQ; KATIYAR, 2011; IKEHATA; ONO, 2011). Também provoca efeitos deletérios indiretamente ao alterar o equilíbrio redox celular através da produção de EROs (AFAQ, 2011). O espectro UVA compreende a radiação mais abundante na superfície terrestre, perfazendo aproximadamente 95% de toda luz solar UV incidente. Somando-se a isto, possui a melhor eficiência de penetração cutânea, podendo atingir 1000µm de profundidade, afetando tanto queratinócitos quanto fibroblastos na derme, por essa razão pode ser responsável pela maioria dos danos crônicos associados ao fotoenvelhecimento cutâneo (SAGE; GIRARD; FRANCESCONI, 2012; NICHOLS; KATIYAR, 2010; SAMBANDAN; RATNER, 2010). Em contraste à radiação UVB, a UVA, ao atingir o DNA produz apenas um pequeno número de dímeros de pirimidina na pele (KOSTOVA, 2008). Por outro lado, é

extremamente eficaz em fotosensibilizar cromóforos endógenos, tais como porfirinas, riboflavinas, bases nucleotídicas, aminoácidos e seus derivados (ácido urocânico, por exemplo), originando EROs (WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2005). Dentre estas destacam-se os radicais livres: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$); radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) e oxigênio singlete (1O_2) (KRYSTON et al., 2011).

As EROs alteram drasticamente a função celular através da oxidação dos lipídeos das membranas biológicas, alterando sua fluidez e diminuindo a eficiência do transporte transmembrana; interação com proteínas; fragmentação e mutação da estrutura do DNA nuclear e mitocondrial, favorecendo o fotoenvelhecimento cutâneo, a imunossupressão, bem como, a patogênese do melanoma (CHEN; HU; WANG, 2012). Portanto, sugere-se que grande parte da ação mutagênica e carcinogênica da radiação UVA é mediada pelas EROs (NICHOLS; KATYAR, 2010).

Evidências substanciais demonstram que as EROs geradas pela exposição da pele à radiação UV estimulam diversos genes e vias de transdução de sinal (REDON et al., 2010; FISHER et al., 2002; ALLEN; TRESINI, 2000).

Três importantes vias envolvendo membros da família das enzimas proteína quinase ativadas por mitógeno são sensibilizadas, incluindo a quinase regulada por sinal extracelular; quinase *c-Jun* amino-terminal (JNK) e p38. Essas vias convergem no núcleo celular e, dois componentes do fator de transcrição, cFos e cJun, se combinam para formar o complexo ativador proteína-1 (AP-1), principal regulador da transcrição dos genes da matriz metaloproteinase (MMP), responsáveis pela produção de collagenase, gelatinase e estromelisina-1. Estas enzimas degradam colágeno, elastina e outros componentes da matriz extracelular. A ativação de *c-Jun* pelo complexo AP-1, após exposição à radiação UV, leva também à inibição da síntese de pró-colágeno do tipo I e tipo III pela redução da expressão dos genes e codificadores destes peptídeos (FISHER et al., 2002).

A degradação enzimática do colágeno é seguida por uma tentativa de reparo da matriz dérmica. No entanto, o reparo não acontece perfeitamente levando à formação de uma estrutura falha que prejudica a organização do colágeno no espaço intracelular. Este defeito na matriz é, então, chamado de "microcicatriz solar", e o acúmulo destas fibras defeituosas origina macrocicatrices que se manifestam clinicamente como rugas (FISHER et al., 2002). Além disso, a radiação UV também é capaz de ativar o fator nuclear κ B (NF- κ B), um importante regulador da expressão de genes essenciais ao processo inflamatório (XIAO, 2004). Nas células em repouso, o NF- κ B reside no citoplasma em um estado inativo, ligado a uma proteína inibidora conhecida como I- κ B. Após ativação por estímulos

extracelulares, como o estresse oxidativo induzido pela radiação solar UV, o I- κ B é fosforilado e degradado por proteossomas e outras proteases. Este processo proteolítico ativa NF- κ B, o qual, em seguida, é translocado para o núcleo celular, onde pode iniciar ou regular a transcrição de genes que regulam a imunidade inata e adaptativa, a inflamação, o crescimento e a sobrevivência celular (LEE et al., 2012). Embora as células possuam um mecanismo natural de defesa antioxidante para neutralizar EROs, o qual inclui sistemas enzimáticos e não-enzimáticos, estes podem ser rapidamente esgotados, ocasionando uma alteração fisiológica no equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, culminando em um estado denominado estresse oxidativo, que parece ser responsável pelo envelhecimento cutâneo e por uma série de desordens patológicas (KRYSTON et al., 2011; KATALANIC et al., 2006).

2.2 Uso de Protetores Solares

Uma importante estratégia de defesa contra os efeitos prejudiciais da radiação solar UV consiste no uso de fotoprotetores (BALOGH et al., 2011; GONZALÉZ; LORENTE; CALZADA, 2008). Estes contêm filtros solares, tradicionalmente classificados em duas categorias: agentes orgânicos ou absorvedores e inorgânicos ou refletores, de acordo com seus mecanismos de ação (FORESTIER, 2008).

Os filtros orgânicos são, essencialmente, compostos aromáticos com grupos carboxílicos, tais como, derivados do ácido para-amino benzóico, derivados do ácido cinâmico, salicilatos, benzofenonas, entre outros (PALM; O'DONOGHUE, 2007). São capazes de absorver a radiação UV e convertê-la em radiações inofensivas ao ser humano (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Entretanto, tais moléculas geralmente apresentam problemas relacionados à sua fotoinstabilidade, conduzindo à formação de EROs quando em contato com a radiação UV (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006). Alguns compostos também possuem potencial alergênico ao penetrar na pele, originando irritações e reações de toxicidade nos usuários (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Os filtros solares inorgânicos, em especial o dióxido de titânio (TiO₂) e o óxido de zinco (ZnO), responsáveis por refletir a radiação que atinge a superfície cutânea, são classificados como materiais semicondutores, que na presença de radiação solar ou artificial são ativados a produzir EROs, dando início à efeitos deletérios na pele (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007; SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007).

Em virtude desses fatos, os fotoprotetores podem não oferecer adequada proteção contra EROs (CHEN; HU; WANG, 2012). Por essas razões, a incorporação de substâncias derivadas de fontes naturais a protetores solares pode contribuir para minimizar os efeitos provocados pelos raios UV por meio do sequestro de radicais livres formados durante a exposição à radiação e/ou podem auxiliar na absorção da luz UV, impedindo que a mesma atinja a superfície cutânea (CHEN; HU; WANG, 2012).

2.3 Fungos

Aproximadamente 80 000 a 120 000 espécies de fungos foram descritas até o momento, no entanto, o número total de espécies estimada é em torno de 1,5 milhões. Esta vasta biodiversidade torna o reino fungi um dos recursos menos explorados do nosso planeta (WEBSTER; WEBER, 2007).

De maneira geral, os fungos são organismos heterotróficos eucariotos, aclorofilados; absorvem o alimento de seu ambiente e apresentam ciclo de vida que incorpora tanto a reprodução sexuada quanto a assexuada. Possuem estruturas somáticas vegetativas filamentosas e ramificadas, com paredes celulares compostas por polissacarídeos complexos, incluindo mananas, galactanos, glucanas e quitina (VARKI et al., 2009).

Os fungos têm uma enorme importância para nossa vida diária, participando de processos tanto benéficos quanto prejudiciais. Do ponto de vista salutar, dentre outros papéis, os fungos têm contribuído grandemente para um melhor entendimento dos processos genéticos (RIQUELME, 2013). Na década de 1940, Beadle e Tatum, a partir de estudos com o fungo filamentoso *Neurospora crassa*, descobriram que os genes eram responsáveis pela produção de proteínas e enzimas, estabelecendo a hipótese um gene-uma enzima; a qual tornou-se um dos grandes conceitos unificadores da biologia, unindo técnicas de pesquisa em genética e bioquímica. Esta hipótese foi a primeira compreensão acerca do funcionamento dos genes (CASSELTON; ZOLAN, 2002; GRIFFITHS et al., 2000; BEADLE; TATUM, 1941).

A partir de então, ampliaram-se os conhecimentos sobre a utilização de fungos como sistemas genéticos, contribuindo para a consolidação da biotecnologia como ciência (VYAS; MOLITORIS, 1995).

Através do melhoramento genético, atualmente é possível obter em larga escala uma variedade de produtos com valor industrial derivados de fungos, nos mais diversos segmentos.

Na indústria de alimentos, por exemplo, são utilizados na produção de produtos fermentados e bebidas alcoólicas. Na indústria farmacêutica, são empregados para a obtenção

de insulina; estatinas; ciclosporinas; taxol; antibióticos, como a penicilina, dentre outros; venenos potentes, incluindo aflatoxinas e tricotecenos; e alguns metabólitos que são tóxicos e farmacologicamente úteis ao mesmo tempo, tais como alcaloides do ergot (Figura I) (KELLER; TURNER; BENNET, 2005; LANGE et al., 2012). Também são de grande importância na biotransformação e produção de enzimas de interesse industrial.

Figura I. Exemplos de alguns compostos farmacologicamente importantes derivados de fungos. (Adaptado de GUIMARÃES, 2009).

Todos estes produtos naturais, juntamente com muitas outras moléculas fúngicas de baixo peso molecular, são classificados em conjunto como metabólitos secundários.

Metabólitos secundários distinguem-se dos primários, que são compostos quase que universalmente distribuídos, produtos do metabolismo intermediário. O metabolismo primário é de domínio da bioquímica, enquanto que o metabolismo secundário é largamente estudado pelos químicos orgânicos.

Metabólitos secundários são geralmente moléculas bioativas, de baixo peso molecular, são produzidos como um grupo de estruturas intimamente relacionadas; com a produção muitas vezes associada a um estágio específico de diferenciação morfológica. Não são essenciais para o crescimento e reprodução do micro-organismo. Sua distribuição taxonômica é, restrita, nem todas as linhagens da mesma espécie produzem as mesmas substâncias. Mínimas alterações nos parâmetros de cultivo, por exemplo, na composição e viscosidade do meio, temperatura, pH e luz influenciam o perfil químico e a quantidade dos metabólitos produzidos pelo fungo (KELLER; TURNER; BENNET, 2005; KOTWAL, et al., 2012)

Metabólitos secundários estão comumente associados com processos de esporulação em micro-organismos, incluindo fungos filamentosos, e podem ser divididos em três

categorias: (i) metabólitos que ativam a esporulação; (ii) pigmentos requeridos pelas estruturas de esporulação (por exemplo melaninas, necessárias para formação ou integridade dos esporos sexuais e assexuais, e corpos de hibernação) e (iii) metabólitos tóxicos secretados pelas colônias em crescimento próximo ao tempo de esporulação. A produção de metabólitos secundários começa geralmente no final do crescimento do fungo, muitas vezes, ao entrar na fase estacionária (BU'LOCK, 1961).

As cepas fúngicas requerem para o seu crescimento e para a produção de metabólitos meios de cultura contendo: água, oxigênio molecular, uma fonte de carbono orgânico e energia e, uma fonte de nitrogênio. De maneira geral, pelo menos treze elementos são essenciais para o crescimento: oxigênio, carbono, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, manganês, ferro, zinco, cobre e molibdênio. Os oito primeiros são necessários, relativamente, em grandes quantidades (macronutrientes), e os cinco últimos, em quantidades menores (micronutrientes) (LACAZ; MINAMI; PURCHIO, 1970).

Levando em conta a variedade de tipos nutritivos, é compreensível que não haja um meio de cultivo universal. Dessa forma, deve se conhecer a fisiologia do micro-organismo em estudo para compor um meio adequado.

2.4 Fungos filamentosos

Macroscopicamente, os fungos exibem dois modos de crescimento, do tipo leveduriformes (levedos ou fungos unicelulares) ou filamentosos (bolors ou fungos multicelulares). Nas leveduras, as colônias apresentam-se esféricas, ovóides ou ligeiramente alongadas, de consistência pastosa ou cremosa, com crescimento limitado e se reproduzem por brotamento ou cissiparidade (CARVALHO, 2010).

Nos fungos filamentosos há uma maior variedade de formas de colônias, por exemplo, quanto à textura podem ser aveludadas, cremosas, butirosas ou mucóides; cotonosas, serosas, camurças, granulosas, membranosas ou coriáceas, verrucosas ou pulverulentas, e apresentarem crescimento invasor (CARVALHO, 2010).

Os fungos filamentosos são micro-organismos normalmente saprófitos, que secretam uma grande variedade de enzimas envolvidas na decomposição e reciclagem de biopolímeros complexos de tecidos de plantas e animais. A maioria destas enzimas são hidrolíticas e desempenham um importante papel na nutrição fúngica, liberando carbono e nitrogênio (EL-ENSHASY, 2007).

Fungos filamentosos são utilizados pela indústria para a produção de uma grande variedade de produtos úteis para a humanidade (Tabela I). Estes incluem metabólitos primários e secundários, enzimas e alimentos. As células fúngicas crescem em diferentes condições ambientais. Condições químicas e físicas utilizadas para a propagação dos fungos exercem grande influência sobre a capacidade destas células em acumular o produto desejado.

Tabela I. Diferentes tipos de produtos industrialmente importantes obtidos de fungos filamentosos (Adaptado de EL-ENSHASY, 2007).

PRODUTO	MICRO-ORGANISMO
ANTIBIÓTICOS	
Penicilina G e V Cefalosporina Griseofulvina Penicilina N Pleuromutilina Ciclosporina A Ciclosporina A e B	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Penicillium patulum</i> <i>Emericellopsis sp.</i> <i>Pleurotus mutilus</i> <i>Tolepocladium inflatum</i> <i>Cylinrocarpum lucidum</i>
ENZIMAS	
Glucose oxidase, pectinase e fitase Xilanase e invertase α -Amilase e glucoamilase Celulase e hemicelulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Trichoderma reesei</i>
MICOTOXINAS	
Aflatoxina, citrinina e ocratoxina Tricotecenos e zearalenona Citrinina e ocratoxina	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>
PROTEÍNAS RECOMBINANTES HETERÓLOGAS	
Interleucina-6 (humana) Ativador do plasminogênio tecidual (tPA) Interleucina-6 (humana)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
OUTROS PRODUTOS	
Riboflavina Ácido cítrico e glucônico Ácido kójico e biotina Ácido itacônico Pululan Biotina Alcalóide ergot Ácido linoleico β -Caroteno	<i>Ashbya gossypii</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Claviceps purpurea</i> <i>Martierella isabellina</i> <i>Phycomyces blakesleanus</i>

2.5 Estratégias de defesa dos micro-organismos contra a radiação UV

Os micro-organismos em sua maioria são expostos à radiação UV durante grande parte ou todo seu ciclo de vida. Os efeitos nocivos que a luz UV provoca aos fungos contribuíram para que eles desenvolvessem um maquinário biológico de proteção objetivando manter a integridade do material genético e outros componentes celulares indispensáveis. Os mecanismos conhecidos de tolerância celular à radiação UV envolvem sistemas complexos que incluem: (i) a síntese de pigmentos, como por exemplo, as melaninas, responsáveis pelo bloqueio da radiação, impedindo que os raios UV atinjam as estruturas celulares; (ii) proteínas, açúcares e micosporinas, que protegem as macromoléculas contra os efeitos deletérios da radiação UV; (iii) sistemas enzimáticos, que possuem a capacidade de reparo aos danos causados pela luz UV; (iv) enzimas e antioxidantes capazes de inativar produtos tóxicos gerados pela radiação UV (SCHIAVE, 2007).

Todos esses mecanismos de proteção ou reparo são essenciais, pois protegem a integridade do genoma e garantem a evolução de organismos vivos na terra.

A síntese de compostos fotoprotetores é uma resposta comum a vários micro-organismos quando expostos a altas doses de radiação UV. De fato, trabalhos na literatura descrevem a biossíntese de substâncias antioxidantes e fotoprotetoras, principalmente carotenoides, por parte de algumas espécies fúngicas, como por exemplo *Epicoccum nigrum* Link; *Alternaria alternata* (Fries) Keissler; *Rhodotorula mucilaginosa*, o que pode otimizar a proteção contra a radiação UV, quando o fungo cresce exposto à luz, em ambientes abertos (GEIS; SZANISZLO, 1984; MOLINÉ, 2010).

Da mesma forma, leveduras negras, da classe dos ascomicetos, sintetizam uma quantidade significativa de pigmentos de melanina nas suas paredes celulares. Isso lhes dá uma vantagem sobre os outros organismos durante o desenvolvimento em condições externas, particularmente sob aumento do nível de radiações ionizantes e UV (BLINOVA et al., 2003).

Outra substância derivada do metabolismo secundário de micro-organismos que tem recebido muita atenção por sua potente atividade bloqueadora da radiação UV é a micosporina, que foi originalmente identificada em fungos. É encontrada também em organismos marinhos em regiões que abrangem os polos até zonas tropicais; entretanto aparecem com maior frequência em espécies tropicais, provavelmente em virtude da maior exposição à radiação UV a que estas espécies estão sujeitas (SINHA; SINGH; HAIDER, 2007).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estabelecer método rápido e simples de selecionar fungos produtores de compostos que absorvem no UV com possível aplicação como filtros orgânicos em protetores solares.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção das Cepas Fúngicas

Trinta e uma cepas fúngicas, provenientes da coleção de fungos filamentosos do laboratório de micro-organismos da Faculdade de Filosofia Letras e Ciências de Ribeirão Preto (FFLC/RP), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira, foram submetidas a uma triagem inicial visando selecionar as cepas produtoras de metabólitos com potencial de absorção na região de 280 a 400 nm. As linhagens estavam conservadas em sílica gel a 4°C e em criopreservação a -80°C. As cepas cedidas não estavam identificadas e foram denominadas de X1 a X31. As cepas que apresentaram potencial fotoprotetor no decorrer dos estudos foram posteriormente identificadas.

4.2 Repique das Cepas / Manutenção

As cepas foram repicadas em tubos de ensaio contendo o meio sólido ágar batata dextrose (PDA) inclinado e incubadas por 7 dias a 30°C.

Após período de crescimento as cepas foram mantidas a 4°C (com repiques mensais).

4.3 Meio de cultivo

4.3.1 Meio líquido

O meio mínimo, conforme Barratt; Johnson; Ogata et al., (1965) foi empregado no crescimento do micro-organismo. (Tabela II)

Tabela II. Composição do meio mínimo.

Componente	Concentração
SAIS DE NITRATO 20X	
NaNO ₃	120g
KCl	10,4g
MgSO ₄	10,4g
KH ₂ PO ₄	30,4g
Água destilada	q.s.p. 1L
SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO 1000X	
ZnSO ₄	2,2g
H ₃ BO ₃	1g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
CoCl ₂ .5H ₂ O	0,16g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16g
Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,11g
Na ₂ EDTA	5g
Água destilada	q.s.p 100 mL
Ajustar pH para 6,5	
MEIO MÍNIMO	
Sais de nitrato (20x)	5 mL
Elementos traço (1000x)	0,1mL
Glicose	1g
Água destilada	q.s.p 100 mL
Ajustar pH para 6,5	

4.4 Suspensão de conídios

Após período de incubação de 7 dias, 5mL de água estéril foram vertidos sobre a superfície do meio sólido de PDA e a superfície foi raspada com o auxílio de um palito descartável estéril para obtenção da suspensão de esporos.

4.5 Preparação do inóculo

A suspensão obtida no *item 4.4* foi filtrada através de gaze em tubos de ensaios, para a eliminação de fragmentos de meio de cultura. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Newbauer, utilizando um microscópio óptico, na objetiva de 40X. Foram inoculados 1×10^6 esporos/mL em cada erlenmeyer de volume de 250ml, contendo 100 mL de meio mínimo (pH 6,5). As cepas foram cultivadas por 7 dias a 30°C, em cultura estacionária e agitada a 120 rpm, conforme representado na Figura II. Dois erlenmeyers contendo o meio de cultura sem inoculação foram submetidos às mesmas condições de estudo dos meios inoculados, servindo como controles negativos.

Todos os materiais utilizados para a preparação do inóculo, incluindo a água, foram esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm por 15 minutos.

Figura II. Esquema da obtenção da suspensão de esporos e preparação do inóculo.

4.6 Obtenção dos extratos

Os meios líquidos aquosos, contendo os metabólitos secretados pelos fungos, foram separados dos micélios através de filtração a vácuo.

O filtrado foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, utilizando o solvente orgânico acetato de etila (AcET) na proporção 1:1 por 3 vezes. O mesmo procedimento foi realizado com os controles negativos.

A fração orgânica obtida foi concentrada em rotaevaporador até volume aproximado de 3 mL. O balão do rotaevaporador foi lavado com 2 mL de AcET, os quais foram adicionados aos 3 mL coletados anteriormente e o volume corrigido para 5 mL em balão volumétrico, no qual 1 ml do extrato concentrado foi utilizado para a medida da absorção na faixa de 280 a 400nm e os outros 4 ml foram liofilizados (Figura III).

Figura III. Esquema da obtenção do extrato fúngico, análise espectrofotométrica.

4.7 Espectros de absorção dos extratos orgânicos

Os extratos orgânicos concentrados, conforme descrito no *item 4.6*, após diluição de 10 vezes em AcET, tiveram os perfis de absorção determinado na região do UV (280-400nm) em espectrofotômetro UV-VIS HITACHI U-2001, em cubeta de quartzo utilizando os controles negativos como branco.

4.8 Avaliação da reprodutibilidade do processo de obtenção dos metabólitos fúngicos

As cepas que cresceram em meio mínimo que produziram compostos com perfil de absorção na faixa de 280 a 400nm foram selecionadas. Para verificar a reprodutibilidade do processo de obtenção dessas substâncias, as cepas dos fungos selecionados foram inoculadas e incubadas em dias diferentes, obtendo-se o resultado final de cinco experimentos (quintuplicata). Os extratos orgânicos obtidos para cada cepa foram concentrados individualmente para 5 mL e as curvas de absorção na faixa de 280 a 400 nm determinadas. A reprodutibilidade do processo de obtenção dos compostos foi analisada para cada cepa pela avaliação visual dos perfis de absorção e pela medida das áreas sob as curvas.

4.9 Avaliação da fotoestabilidade do extrato orgânico selecionado sob radiação UVA e UVB

Amostras de 4mg dos extratos selecionados foram aplicadas sobre a superfície de uma placa de quartzo e submetidas às radiações UVA (11,20 J/cm²) e UVB (3,43 J/cm²), utilizando o sistema de irradiação Bio-Espectro 3, Vilber Lourmat, França. A quantidade da radiação incidente equivale a duas horas de exposição solar no período das 11 às 13 horas (FIGUEIREDO, 2013). Após a irradiação, o extrato foi solubilizado em solução de pluronic 1,5% em água, obtendo-se uma solução dos extratos irradiados e não irradiados. A fotoestabilidade dos extratos irradiados foi avaliada por medida da viabilidade de células de fibroblastos em cultura de célula e pelo perfil de absorção na faixa de 280 a 400 nm (Figura IV).

Figura IV. Esquema do método de determinação da fotoestabilidade dos extratos orgânicos.

4.10 Determinação da viabilidade celular das células de fibroblastos L929 expostas às soluções do extrato irradiado e não irradiado

Foram utilizadas neste estudo células de fibroblastos da linhagem L929 (camundongo) adquiridas do Banco de Culturas comerciais. Essas foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), penicilina (100U/mL), estreptomicina (0,1mg/mL) e anfotericina B (0,25µg/mL); e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. As células foram mantidas em crescimento com trocas do meio de cultivo a cada 2 dias. Após atingida a confluência de 80%, as células foram desagregadas usando tripsina 0,25% obtendo-se uma suspensão de células no meio DMEM.

4.10.1 Preparo das amostras dos extratos irradiados e não irradiados

Os extratos irradiados e não irradiados foram solubilizados em solução de pluronic 1,5% em água obtendo-se as soluções mães. Estas soluções foram diluídas em solução aquosa de pluronic 1,5% para obter soluções com concentrações variadas.

4.10.2 Medida da viabilidade celular pelo vermelho neutro

Suspensão de Células de fibroblasto da linhagem L929 preparada como mencionada no item 4.10, foram semeadas em placas de 96 poços contendo 1×10^5 células/poço e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 12 horas de incubação, o meio de cultura

DMEM foi descartado e as células lavadas com salina. A seguir, 20 μL das soluções irradiadas e não irradiadas do extrato nas concentrações de 25 a 400 $\mu\text{g/mL}$, foram adicionados às células, seguido pela adição de 180 μL de meio incompleto. As células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Após vinte e quatro horas de tratamento, os extratos e o meio incompleto foram descartados e, 200 μL da solução de vermelho neutro na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada em estufa de cultura de células por 3 horas. Após este período, o vermelho neutro foi removido e as células foram lavadas com uma solução de formaldeído 1% (v/v) e CaCl_2 1% (p/v); e, em seguida, foram adicionados 200 μL de etanol com ácido acético 1% (v/v). A leitura da absorbância foi realizada após 30 minutos à temperatura ambiente em leitor de microplacas (μQuant) em 540nm (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento.

4.11 Comparação dos espectros de absorção dos extratos irradiados e não irradiados

Os extratos selecionados foram submetidos às radiações UVA e UVB, como descrito no *item 4.9* e, o extrato não irradiado em Pluronic 1,5% em água, nas concentrações de 40 $\mu\text{g/mL}$ para o X12 e 107 $\mu\text{g/mL}$ para o X31 tiveram os perfis de absorção espectrofotométricos na faixa de 280-400 nm determinados em espectrofotômetro UV-VIS HITACHI U-2001. A fotoestabilidade dos extratos foi avaliada por comparação dos perfis de absorção das soluções do extrato irradiado e não irradiado.

4.12 Identificação molecular das cepas fúngicas selecionadas

4.12.1 Crescimento do fungo e Extração de DNA

Os fungos foram isolados e cultivados em meio líquido SR (Tabela III) em erlenmeyers com 100mL (RIZZATTI, 2001), por 24h.

Tabela III. Composição do meio SR.

Componentes	Concentração
SOLUÇÃO DE SAIS SR [20X]	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,24g
KH ₂ PO ₄	0,3g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0g
Água destilada	q.s.p 100mL
MEIO SR	
Solução de sais SR [20x]	5,0 mL
Peptona	0,02g
Extrato de levedura	0,45g
Fonte de carbono	1,0g
Água destilada	q.s.p. 100mL

Após 24 horas os micélios formados foram filtrados, macerados com N₂ líquido e distribuídos em tubos eppendorfs para extração do DNA seguindo o protocolo de Cervelatti (CERVELATTI et al., 2006): adicionou-se a cada eppendorf 0,7 ml de solução de lise (1% SDS, 5mM EDTA e no pH8,0) e macerou-se com pistilo plástico. As misturas foram incubadas em banho-maria por 15 minutos, a 68°C e centrifugadas em seguida a 18928xg, 4°C por 10 minutos. De cada amostra coletou-se 400µL do sobrenadante, adicionou-se 40µL de acetato de potássio 3M pH 8,0 e incubou por 10 minutos em gelo. Após, cada amostra foi centrifugada por 5' e transferido o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico misturando gentilmente por inversão. As amostras foram novamente centrifugadas por 5' e recolhido o sobrenadante. Adicionou-se 1mL de etanol absoluto para a precipitação dos ácidos nucleicos. As amostras foram centrifugadas e após descartado o sobrenadante. Os pellets dos DNAs formados foram lavados 2 vezes com 500µL de etanol 70% e deixado secar. Por fim, os pellets foram eluídos com 50µL de água miliQ contendo RNase (10µg/ml) e incubados a 37°C por 30'. Os DNAs foram estocados a -20°C até o próximo uso.

4.12.2 Amplificação através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As amostras do DNA foram submetidas a PCR para amplificação da região *ITS*. A reação de PCR utilizada foi efetuada para um volume final de 50 µL cada amostra, contendo 34,0µL de água q.s.p. estéril, 5µL de tampão (1x tampão PCR marca Sigma), 3µL de MgCl₂, 4µL da mistura dos desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP; dTTP; dGTP; dCTP), 1µL de

cada um dos primers iniciadores ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' forward, e ITS2 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3' reverse, 1 µL da respectiva amostra de DNA e 1,0 µL de Taq-DNA-polimerase. As reações foram realizadas em um termociclador programado para 35 ciclos de temperaturas: 95°C durante 2-3 minutos para a desnaturação, 56 °C por 30 segundos para o pareamento dos primers e 68°C por 10 minutos para a fase de extensão final (WHITE *et al.*, 1990). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose (agarose 1,0%, 0,04 M Tris-acetato e 1 mM Na-EDTA), revelados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação UV.

A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando um kit de purificação da GE Healthcare (GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit) e a determinação das sequências utilizando os primers ITS1 e ITS2 foram realizadas pelo Laboratório de Genética Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto utilizando o sequenciador automático ABI 3500XL. As sequências determinadas foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do Centro Nacional de Informações em Biotecnologia (NCBI) utilizando a ferramenta básica de alinhamento local (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> website).

4.13 Identificação da substância ativa do extrato X12

O extrato selecionado foi analisado por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, em um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência modelo Thermo[®] Accela, com sistemas de bombas modelo *Accela 1250 pump*, acoplado a um detector de arranjo de diodos modelo *Accela PDA detector* e a um espectrômetro de massas modelo Thermo[®] Exactive Plus com analisador do tipo Orbitrap[®], utilizando uma coluna de fase reversa C18 (Hypersil Gold[®], 50 x 2,1 mm, Thermo Fisher Scientific[®],) com tamanho de partícula de 1,9 µm e pré coluna C-18 (Phenomenex[®], EUA).

Para a realização da análise cromatográfica, empregou-se o seguinte programa de eluição em gradiente: bomba A – H₂O (0,1% Ácido Fórmico), bomba B – MeCN (0,1% Ác. Fórmico); gradiente – 0 min (5% B), 3 min (5% B), 30 min (100% B), 35 min (100% B), 40 min (5% B); fluxo da fase móvel: 0,3 mL/min.

A temperatura do forno da coluna foi mantida em 30 °C e a do injetor automático com a amostra, em 10 °C. O detector *Accela PDA detector* foi operado entre 200 e 600 nm empregando-se três canais em diferentes comprimentos de onda, para a obtenção dos cromatogramas, sendo o canal A: 230, canal B: 270 e canal C: 325 nm.

O espectrômetro de massas foi operado nos modos positivo e negativo simultaneamente numa resolução de 70,000 e faixa de varredura de 150-2000 *m/z*. Foi

injetado um volume de 10 μ L de cada extrato num tempo máximo de injeção de 250 ms. Os parâmetros da fonte de ionização por Heated Electrospray (HESI) foram: voltagem do spray de 3,6 kV no modo positivo e -3,2 kV no modo negativo, temperatura do capilar e do aquecedor de 300 °C, fluxo de nitrogênio (sheath gas) de 30 unidades e nível de *S-lens* RF de 55.

Antes de iniciar as análises, o espectrômetro de massas foi calibrado de acordo com as especificações da *Thermo Fisher Scientific* para cada polaridade separadamente. No modo positivo empregou-se uma solução de cafeína, acetato de *L*-metionil-arginil-fenilalanina (MRFA), solução estoque *Ultramark 1621* e *n*-butilamina em MeCN: metanol (MeOH): H₂O contendo 1% de ácido acético. No modo negativo se empregou uma solução de dodecil sulfato de sódio, taurocolato de sódio e a solução estoque *Ultramark 1621* em MeCN: MeOH: H₂O com 1% de ácido acético.

5 Resultados e Discussão

5.1 Extração dos compostos que absorvem a radiação da região do UVA e UVB

Os metabólitos produzidos por fungos podem ser intracelulares e/ou extracelulares (VELMURUGAN et al., 2010). A extração de metabólitos intracelular exige a separação e lavagem da massa micelial, seguido pela extração dos compostos de interesse pela imersão da biomassa em solvente de escolha. Após o processo de extração a massa micelial é triturada e lavada com o solvente para completa retirada dos metabólitos do micélio, resultando em um grande número de compostos como proteínas, açúcares, ácidos graxos, aminoácidos, alcoóis, ácidos orgânicos, nucleotídeos, dentre outros (VILLAS-BÔAS et al., 2005). Alguns desses compostos apresentam absorção na região do UV (ANTHIS; CLORE, 2013), dificultando a análise espectrofotométrica, por esta razão optou-se por não realizar a extração intracelular neste trabalho.

A extração de metabólitos extracelular envolve processo de separação da massa micelial do meio de cultura que pode ser por centrifugação ou filtração, seguido, pelo processo de extração dos compostos da fração sobrenadante ou filtrado.

O método mais empregado para extração de compostos de baixa massa molecular do meio de cultura é a extração líquido-líquido que se baseia nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra entre solventes imiscíveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Talvez esta técnica seja a maneira mais antiga de se extrair compostos de uma matriz, no entanto, ainda é muito utilizada no preparo de amostras, e continua sendo a mais empregada por ser considerada uma técnica simples, que não exige instrumentação sofisticada, e de fácil execução (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007). Os solventes apolares são os mais empregados para a extração de compostos polifenólicos, dentre estes destacam-se: acetato de etila, dimetil sulfóxido, metanol e acetona (BERTOLDI, 2006).

Para otimizar a extração de compostos com potencial fotoprotetor a partir dos extratos das cepas fúngicas, foi empregado neste trabalho o acetato de etila, um éster líquido, transparente, de polaridade moderada e, quanto aos possíveis riscos à saúde humana, está inserido na classe 3 de solventes com baixo potencial tóxico segundo o ICH (2011). Por estas razões o acetato de etila é bastante utilizado como solvente extrator de diversos compostos.

Os meios de cultura resultantes da inoculação e incubação das 31 cepas de fungos filamentosos, em culturas agitadas e estacionárias, após separação da massa micelial, foram extraídos três vezes com o solvente orgânico acetato de etila. As fases orgânicas concentradas para 5ml e diluídas 10 vezes em acetato de etila tiveram determinados os seus espectros de absorção na região do UV (Figura V).

Os extratos dos fungos cultivados em cultura agitada que demonstraram melhor perfil de absorção espectrofotométrico foram aqueles obtidos a partir das cepas X2, X4, X6, X17, X18, X19 e X26. Esses extratos absorveram a radiação em toda extensão da região do UV (280 a 400 nm), com picos máximos de absorção em 335 nm para os extratos das cepas X2 e X6, 300 nm para os extratos X4 e X19, 290 nm para o extrato X17, 345 nm para o extrato X18 e 340nm para o extrato X26.

Em cultura estacionária, os melhores perfis foram observados para os extratos das cepas X1, X2, X6, X12, X13, X14, X18, X19, X21, X22, X23, X24 e X31 com picos de absorção em 310 nm para os extratos X1 e X21, 320 nm para os extratos X6, X14, X24 e X31, 335 nm para os extratos X2 e X18, 400 nm para o extrato X12, 330 nm para o extrato X13, 310 nm para o extrato X19, 295 nm para o extrato X22, 305 nm para o extrato X23 e 340nm para o extrato X26, na região do UVB e UVA com exceções das cepas X1 e X21 que absorvem na região do UVB.

Perfis espectrofotométricos semelhantes foram observados para os extratos X2, X6, X18 e X26 em cultura agitada e cultura estacionária.

Os perfis espectrofotométricos obtidos foram comparados ao do butil metoxidibenzoilmetano (avobenzona), comercialmente denominado PARSOL 1789[®], capaz de absorver as radiações UVA-II e UVA-I, com máximo de absorção em 358 nm, em função da sua habilidade de transição entre as funções cetônica e enólica (LOPES; CRUZ; BATISTA, 2012). Por isso, é um dos filtros solares orgânicos UVA mais utilizados no mundo (Figura V).

Os extratos obtidos, com exceção do X1 e X21 apresentaram perfil de absorção espectrofotométrico na região UVA, além disso, para todos os extratos citados, observa-se uma boa absorção também na região do UVB. Supõe-se que a capacidade dos extratos de absorver as radiações UVA e UVB, não demonstrada pela avobenzona, deve-se aos diferentes compostos químicos presentes no extrato.

Figura V. Características das colônias dos fungos estudados no meio de PDA, e os espectros de absorção na região do UV pelos compostos extracelulares produzidos pelos fungos em meio líquido mínimo em culturas agitadas e estacionárias e o espectro de absorção da solução etanólica do filtro orgânico butil metoxidibenzoilmetano (BMDM) na concentração de 5,5 µg/mL.

Fungos	Fenotipo	Cultura agitada	Cultura estacionária
X1
X2
X3
X4
X5
X6

<p>X7</p>
<p>X8</p>
<p>X9</p>
<p>X10</p>
<p>X11</p>
<p>X12</p>

X13		<p>Absorbância vs. nm for X13. The curve shows a broad peak centered around 320 nm with an absorbance of approximately 1.2. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from -1 to 3.</p>	<p>Absorbância vs. nm for X13. The curve shows a broad peak centered around 320 nm with an absorbance of approximately 2.5. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>
X14		<p>Absorbância vs. nm for X14. The curve shows a peak at approximately 300 nm with an absorbance of approximately 1.0. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>	<p>Absorbância vs. nm for X14. The curve shows a broad peak centered around 320 nm with an absorbance of approximately 2.5. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>
X15		<p>Absorbância vs. nm for X15. The curve shows a peak at approximately 320 nm with an absorbance of approximately 0.5. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from -1 to 3.</p>	<p>Absorbância vs. nm for X15. The curve shows a peak at approximately 320 nm with an absorbance of approximately 0.8. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from -1 to 3.</p>
X16		<p>Absorbância vs. nm for X16. The curve shows a broad peak centered around 350 nm with an absorbance of approximately 0.5. The x-axis ranges from 300 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>	<p>Absorbância vs. nm for X16. The curve shows a broad peak centered around 350 nm with an absorbance of approximately 0.5. The x-axis ranges from 300 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>
X17		<p>Absorbância vs. nm for X17. The curve shows a peak at approximately 300 nm with an absorbance of approximately 2.0. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>	<p>Absorbância vs. nm for X17. The curve shows a peak at approximately 300 nm with an absorbance of approximately 1.5. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>
X18		<p>Absorbância vs. nm for X18. The curve shows a broad peak centered around 340 nm with an absorbance of approximately 2.5. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>	<p>Absorbância vs. nm for X18. The curve shows a broad peak centered around 340 nm with an absorbance of approximately 2.8. The x-axis ranges from 280 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 3.</p>

X19
X20
X21
X22
X23
X24

<p>X25</p>
<p>X 26</p>
<p>X27</p>
<p>X28</p>
<p>X29</p>
<p>X30</p>

X31
BMDM	5,5µg/ml Etanol

A partir do *screening* realizado, foram selecionadas para as próximas etapas do estudo as cepas X1, X2, X6, X12, X13, X18, X19, X22, X24 e X31 em cultura estacionária e X4 e X17 em cultura agitada.

5.2 Avaliação da reprodutibilidade do processo de obtenção dos metabólitos fúngicos

Mínimas alterações nos parâmetros de cultivo, por exemplo, na composição e viscosidade do meio, temperatura, pH e luz influenciam o perfil químico e a quantidade dos metabólitos produzidos pelo fungo (KOTWAL et al., 2012). Além disso, a qualidade dos esporos inoculados também influencia o crescimento fúngico e a produção de compostos. Desta forma, o modo de preservação do fungo e o número de repiques ao qual este é submetido são fatores importantes a serem controlados para reprodutibilidade da síntese de metabólitos. (ZIMMERMANN, 2013).

Um dos maiores problemas na produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico, cosmético e para a indústria de alimentos está na reprodutibilidade da síntese dos compostos pelo fungo. Assim, a reprodutibilidade do perfil de absorção UV dos metabólitos extraídos, produzidos pelas cepas fúngicas, foi avaliada. Suspensões de esporos das cepas selecionadas foram inoculadas em meios de cultivos preparados em dias diferentes e incubadas, num total de cinco culturas. No final da incubação os meios de cultura foram submetidos ao procedimento de extração.

A reprodutibilidade do processo foi avaliada pela comparação dos perfis espectrofotométricos dos extratos orgânicos obtidos da extração líquido-líquido dos meios de cultura e pela medida da área sob a curva.

A análise visual dos perfis de absorção na região do UV das quintuplicatas dos extratos orgânicos obtidos de cada cepa mostra que não houve alterações significativas quanto ao perfil do espectro de absorção, mas observa-se diminuição da quantidade absorvida (Figura VI).

A Tabela IV apresenta os valores das áreas sob a curva de absorção e os respectivos coeficientes de variação (CV), que variam de 6,8% a 43,4%. Este alto CV já era esperado baseando-se na premissa de que nem sempre uma cultura fúngica cresce da mesma maneira que a outra, mesmo sendo a mesma espécie, uma vez que o crescimento do fungo exige a ação coordenada de várias enzimas, marcadores e elementos do citoesqueleto que permite a síntese e extensão do filamento fúngico (RIQUELME, 2013). A complexidade do mecanismo de reprodução celular, associado a mínimas variações no ambiente e nutrição dos fungos afetam a quantidade, qualidade e diversidade dos metabólitos secundários produzidos (KHAN et. al., 2011).

Figura VI. Perfis de absorção dos extratos orgânicos extraídos das culturas dos fungos escolhidos em meio líquido de Barratt; Johnson; Ogata (1965), no qual cada cor representa o perfil de absorção obtido em dias diferentes, obtendo-se o resultado final de cinco experimentos em dias distintos(quintuplicata).

Figura VI. Perfis de absorção dos extratos orgânicos extraídos das culturas dos fungos escolhidos em meio líquido de Barratt; Johnson; Ogata (1965), no qual cada cor representa o perfil de absorção obtido em dias diferentes, obtendo-se o resultado final de cinco experimentos em dias distintos (quintuplicata).

Tabela IV. Valores das áreas sob as curvas de absorção e os correspondentes coeficientes de variação provenientes das culturas dos fungos em meio mínimo de Barratt; Johnson; Ogata (1965).

FUNGO	Área sob a curva de absorção	CV (%)
X1	19,52	25,87
X4	77,23	6,8
X5	12,55	20,15
X6	97,28	30,26
X12	204,7	7,2
X13	43,78	23,70
X17	88,94	25,79
X18	7,66	43,4
X19	105	11,11
X22	169	14,4
X24	120,02	9,6
X31	159,1	9,6

De acordo com a ANVISA (2014), a análise estatística dos parâmetros microbiológicos é com frequência, bastante variável, sendo considerada aceitável uma variação de até 30% para os métodos analíticos que empregam micro-organismo. Além disso, vários autores sugerem que um CV é considerado baixo quando for menor ou igual a 25%

(SILVA et. al., 2011; MENDONÇA, 2012; PEREIRA; LACERDA; MAINER, 2006). FERREIRA (1991) propõe a seguinte classificação para os CVs em relação à precisão experimental: ótima: $\leq 10\%$; boa: $10\% < CV \leq 15\%$; regular: $15\% < CV \leq 20\%$; ruim: $20\% < CV \leq 30\%$; péssimo: $CV > 30\%$.

Baseando-se nesses dados foram selecionados para as próximas etapas do estudo as cepas fúngicas que apresentaram um CV menor do que 15%; que foram o X4, X12, X19, X22, X24 e X31.

5.3 Avaliação da fotoestabilidade do extrato orgânico selecionado sob radiação UVA e UVB

5.3.1 Citotoxicidade em cultura de células da linhagem L929

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pela medida da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro, o qual se baseia na capacidade de penetração do corante através da membrana plasmática e acúmulo nos lisossomos das células viáveis não injuriadas (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988).

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com os extratos X4, X12, X19, X22, X24 e X31 não irradiados e após a exposição à luz UVB ($3,43 \text{ J/cm}^2$) e UVA ($11,2 \text{ J/cm}^2$). A citotoxicidade dos extratos irradiados e não irradiados foi comparada para verificar possíveis alterações nas estruturas químicas dos componentes, decorrentes de reações de fotodegradação dos extratos, poderiam afetar a viabilidade celular de maneira mais intensa.

A Figura VII apresenta os resultados de citotoxicidade para os extratos não irradiados e irradiados com luz UVA e UVB. De maneira geral foi observado uma redução da viabilidade celular dose dependente para todos os extratos não irradiados.

Figura VII. Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com diferentes concentrações dos extratos não irradiado (cor verde), irradiado com radiação UVA (11,20 J/cm²) (vermelho) e UVB (3,43 J/cm²) (azul); este resultado representa a média de três determinações.

Os valores de IC₅₀ dos extratos não irradiados na Tabela V.

Tabela V. Valores de IC₅₀ obtidos para viabilidade celular em linhagem L929 para os extratos fúngicos não irradiados.

Extrato	IC ₅₀ µg/ml
X4	115,9
X12	35
X19	19,1
X22	8,6
X24	62,9
X31	50

Após a irradiação com luz UV os extratos X4 (IC₅₀ 115,9 µg/ml), X19 (IC₅₀19,1µg/ml), X22 (IC₅₀ 8,6 µg/ml) e X24 (IC₅₀ 62,9µg/ml) apresentaram redução significativa da viabilidade celular em relação ao IC₅₀ de 28%; 39%; 36%; 6%; respectivamente, para a radiação UVA (11,2 J/cm²) e de 40%; 23%; 42%; 22%; respectivamente, para a radiação UVB (3,43 J/cm²). Isto indica que a exposição dos extratos à radiação UV foi capaz de degradá-los e gerar produtos com potencial citotóxico superior ao extrato não irradiado.

Por outro lado, sob radiação UVB, dois outros extratos , o X12 (IC₅₀ 35µg/ml) e X31 (IC₅₀ 50µg/ml) mantiveram a mesma redução de 50% de viabilidade celular quando comparado ao IC₅₀ dos mesmos não irradiados. Já sob a luz UVA, o extrato X12 apresentou uma viabilidade celular de 75%, ou seja, o número de células viáveis aumentou em 25% comparado com o extrato não irradiado. Isso sugere que a radiação UVA pode ter degradado os componentes tóxicos do extrato X12 tornando-o menos prejudicial à célula; enquanto que o extrato X31 manteve a mesma redução de 50% após exposição à radiação UVA. Por essa razão foram selecionados para continuidade do trabalho os extratos X12 e X31.

É bem documentado que a radiação UV pode causar a ativação fotoquímica de moléculas, incluindo alguns ingredientes cosméticos, como filtros solares, os quais, quando em contato com sistemas biológicos (através da aplicação direta à pele ou exposição sistêmica), podem provocar efeitos nocivos, como por exemplo, eritema/edema; alterações na pigmentação cutânea; irritação ocular; fotoalergia e fotocarcinogênese (KLEINMAN et al., 2010), causados pela formação de subprodutos fototóxicos (LYNCH; WILCOX, 2009).

Como uma característica indispensável para um filtro solar é a ausência de fototoxicidade, realizar ensaios que visem identificar a indução de produtos tóxicos pela

radiação UV é de suma importância para a pesquisa de novas substâncias com potencial fotoprotetor derivadas de extratos de fungos.

Os fungos constituem um grupo microbiano extremamente diverso, com uma ampla variedade de morfologias, metabolismos e habitats. Estima-se que o planeta abrigue 1,5 milhões de espécies, dos quais apenas cerca de 5% são identificadas (HAWKSWORTH, 2001). Esta é uma das dificuldades de se trabalhar com fungos, uma vez que são escassas na literatura as informações acerca dos possíveis metabólitos secundários produzidos por estes micro-organismos, devido à sua grande biodiversidade. Portanto, o ensaio de citotoxicidade e fototoxicidade é fundamental para a seleção de extratos fúngicos não fototóxicos, já que, a princípio, desconhecemos os componentes químicos que constituem o extrato.

5.3.2 Comparação dos espectros de absorção dos extratos irradiados e não irradiados

Além da medida da viabilidade celular frente às soluções dos extratos irradiados e não irradiados, a fotoestabilidade dos extratos X12 e X31, foi avaliada pelas análises visuais dos perfis de absorção espectrofotométricos obtidos pelos extratos irradiados (UVA (11,2 J/cm²) e UVB (3,43 J/cm²)), e não irradiados; e pela determinação das áreas sob as curvas de absorção.

A Figura VIII mostra os perfis de absorção na região do UV dos extratos X12 e X31 irradiados com luz UVA (11,2 J/cm²), UVB (3,43 J/cm²) e não irradiado. O espectro obtido do extrato X12 mostra uma redução da absorbância de 28,3% sob radiação UVB e de 60% sob radiação UVA em relação ao extrato não irradiado. O extrato X31 apresentou uma redução da absorbância de 17,6% e 30% sob radiação UVB e UVA respectivamente, em relação ao extrato não irradiado. Tomando por base as observações de Lopes; Cruz e Batista (2012), podemos sugerir que os componentes com capacidade de absorção das radiações UVA e UVB de ambos os extratos são fotoinstáveis, sendo o extrato X31 mais estável. No entanto, a avobenzona, apesar de ser amplamente utilizada em produtos fotoprotetores em virtude de sua eficácia comprovada, é fotolábil. Estudos de fotoestabilidade mostraram que a avobenzona tem sua capacidade fotoprotetora reduzida de 50 - 60% após uma hora de radiação ao sol (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Apresentando, portanto uma fotodegradação maior do que a observada para os extratos estudados. Da mesma forma, a benzofenona 3, e os Cinamatos, podem ser citados como filtros fotoinstáveis. (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; RAI; SRINIVAS, 2007; BALOGH, et al., 2011).

O mecanismo de ação dos filtros orgânicos baseia-se na absorção de um fóton de energia, seguida de uma mudança do estado fundamental para o estado excitado, de maior

energia. A molécula retorna ao estado fundamental ao dissipar sua energia, o que pode ocorrer através das vias que destroem a molécula, tais como fragmentação, reação bimolecular, determinadas isomerizações; ou por meio das vias que preservam a molécula, as quais podem ser mecanismos de fluorescência, fosforescência, e transferência de energia para outras moléculas. O filtro orgânico é considerado fotoestável caso as vias de preservação da molécula prevaleçam frente às vias de destruição. Se o oposto ocorrer, a molécula será fotoinstável (LOPES; CRUZ; BATISTA, 2012).

Visando contornar o problema da fotodegradação dos filtros solares, as indústrias têm desenvolvido formulações mais sofisticadas, incorporando antioxidantes, produzindo sistemas de encapsulação, dentre outras estratégias para garantir a fotoestabilidade do produto (DAMIANI, BASCHONG, GRECI, 2007; NASH, TANNER, 2014; AFONSO, et al., 2014).

Figura VIII. Espectro de absorção na região UV (280-400nm) do extratos X12 e X31 não irradiado e irradiado com luz UVA e UVB.

5.4 Identificação molecular do fungos selecionados

Os fungos selecionados foram identificados pela bolsista técnica Luciana Ziotti, no laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto em parceria com o Departamento de Micologia do Centro de

Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco e o Hemocentro da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

O método empregado para a identificação das espécies baseou-se em técnicas moleculares de extração de DNA, PCR descritas no item 4.12.2 e sequenciamento.

É imprescindível a aplicação de métodos moleculares para a identificação micro-organismos, pois permite uma identificação mais precisa em nível de gênero e espécie. Estas técnicas moleculares são baseadas no sequenciamento de nucleotídeos da região *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*) (OLIVEIRA et al., 2011). Essa região é uma das repetições do DNA ribossomal e é um marcador utilizado para identificação molecular de fungos (NAIME, 2009). O DNA ribossomal (DNAr) possui sequências intercalares, que variam intra e interpopulacionalmente, e sequências codificadoras altamente conservadas e que servem como marcadores para comparação entre táxons divergentes e até mesmo entre diferentes reinos (MATEUS et al., 2006).

Na técnica de PCR utilizou-se primers universais específicos para amplificar as regiões do ITS (Figura IX). Primers iniciadores universais de PCR são projetados a partir de regiões altamente conservadas que cercam o ITS e, seu tamanho relativamente pequeno (600-700 pb) permite a ampliação da sua região devido ao grande número de cópias de rDNA. E isso faz com que a região do ITS assuma um papel importante para investigações filogenéticas em processos evolutivos (SHARMA et al., 2000). Para confirmar a presença dos DNAs após a técnica de PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose (Figura X).

Figura IX. Sequência dos primers universais utilizados em PCR. (WHITE et al., 1990)

rRNA	GenePrimer ^a	Product Size (bp) ^b	T _m (°C) ^c
Nuclear, small			
NS1	GTAGTCATATGCTTGCTC	555	56
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC		68
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	597	68
NS4	CTTCGGTCAATTCCTTAAAG		56
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	310	57
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC		65
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	377	65
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA		65
Nuclear, ITS			
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290	65
ITS5	GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	315	63
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	290	62
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	330	62
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		58
Mitochondrial, small			
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	716	65
MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC		63
Mitochondrial, large			
ML1	GTACTTTTGCAATAATGGGTCAGC	253	68
ML2	TATGTTTCGTAGAAAACGAGC		63
ML3	GCTGGTTTCTACGAAACATATTTAAG	934	67
ML4	GAGGATAATTGCCGAGTTCC		68
ML5	CTCGGCAAATTATCCTCATAAG	359	66
ML6	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC		65
ML7	GACCCATGACAGCTTCTACTG	735	63
ML8	TTATCCCTAGCGTAACCTTTATC		57

Figura X. Eletroforese em gel de agarose mostra um marcador de massa molecular (da marca Promega) na coluna 2; amplificação do ITS1 e ITS2 para o fungo *Talaromyces pinophilus*, na coluna 3; amplificação do ITS1 e ITS2 para o fungo *Aspergillus terreus* na coluna 5. Ambos os fungos com aproximadamente 300 pares de base, assim condizente com o tamanho esperado para estes primers universais que é de 290 pares de base (Figura IX).

Os produtos de PCR foram sequenciados, e as sequências obtidas foram analisadas com o programa BLAST. Este é uma ferramenta de busca de similaridades entre sequências biológicas, que fornece informações quanto à homologia entre as sequências obtidas com aquelas depositadas no Gen BanK, o banco público de sequências mais utilizado no mundo, com dados de mais de 100.000 organismos (PERTSEMLIDIS & FONDON, 2001).

Tabela VI. Resultado da identificação através da ferramenta Blast do banco de dados online do “ncbi”, da sequência do fungo X12 fornecida pelo Hemocentro de Ribeirão Preto.

Fungo	Sequência	Homologia	Max. Score	Valor de E-value	Identidade
X12	ITS 1 (Foward)	<i>Aspergillus terreus</i>	379	9e-102	100%
X12	ITS 2 (Reverse)	<i>Aspergillus terreus</i>	379	3e-97	99%

Tabela VII. Resultado da identificação através da ferramenta Blast do banco de dados online do “ncbi”, da sequência do fungo X31 fornecida pelo Hemocentro de Ribeirão Preto.

Fungo	Sequência	Homologia	Max. Score	Valor de e	Identidade
X31	ITS 1 (Foward)	<i>Talaromyces pinophilus</i>	387	6e-104	100%
X31	ITS 2 (Reverse)	<i>Talaromyces pinophilus</i>	388	2e-104	99%

Com base nos dados obtidos por PCR apresentados nas Tabelas VI e VII, é possível propor que as espécies X12 e X31 em questão tratam-se dos fungos *Aspergillus terreus* e *Talaromyces pinophilus*, respectivamente.

Os gêneros *Aspergillus* e *Talaromyces* abrangem um elevado número de espécies bastante diversas. Estas espécies produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Estes são pequenas moléculas produzidas durante a fase de diferenciação química e morfológica e são secretados para os exteriores ou armazenados e acumulados sobre a parede celular, em contraste com os metabólitos primários, cujas concentrações são flutuantes e são requeridos para a síntese de outros metabólitos primários, secundários, proteínas, polissacarídeos e estruturas morfológicas.

Enquanto metabólitos primários podem ser encontrados em quase todas as espécies de fungos (e a maioria dos outros tipos de micro-organismos), metabólitos secundários, proteínas e polissacarídeos são taxonomicamente restritos, sendo produzidos especificamente por algumas espécies. Alguns metabólitos podem ocorrer tanto como metabólitos primários quanto secundários, como é o caso do ácido cítrico, por exemplo. Quando o ácido cítrico é parte do fluxograma mitocondrial, deve ser considerado um metabólito secundário; no entanto, quando é secretado e acumulado, como em *Aspergillus niger*, deve ser classificado como metabólito primário (FRISVAD; ANDERESSEN; THRANE, 2015).

5.5 Identificação da substância ativa

Os fungos são organismos notáveis que rapidamente produzem uma ampla gama de produtos naturais, resultando em extratos brutos complexos compostos por dezenas ou centenas de metabólitos secundários (CALVO, 2002). Tal complexidade torna essencial uma detecção e caracterização eficiente das substâncias.

Várias técnicas têm sido empregadas para a desreplicação de extratos brutos. Uma das mais utilizadas para é a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS). O processo de desreplicação é realizado através da utilização de dados provenientes de métodos analíticos hifenado de alta precisão associados a banco de dados de substâncias, o que permite que os compostos presentes no extrato bruto sejam comparados com aqueles já identificados (NIELSEN, 2011).

Essa abordagem evita que compostos já conhecidos sejam reisolados, poupando gastos excessivos e desnecessários, dentre estes, o consumo da amostra e de solventes (EL-ELIMAT, 2013).

Os perfis cromatográficos do extrato fúngico X12, foram analisados por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e estão apresentados na Figura XI, tanto para o modo de ionização positivo (A) quanto negativo (B).

Figura XI. Cromatograma de íons totais (TIC) no modo positivo (A) e negativo (B) do extrato X12.

Figura XII. Cromatograma com detector de UV nos canais A, B e C do extrato X12.

Podemos observar na Figura XII o pico da substância presente no extrato com capacidade de absorção na região do UV, com tempo de retenção de 14,23min, sugerindo que seja esta a substância responsável pela capacidade do extrato em absorver radiação UV.

O espectro de massas no modo positivo do pico em TR 14,23min (Figura XIII A) apresenta uma molécula protonada $[M+H]^+$ com um valor de massa/carga de 403,21218 m/z e outro pico em 805,41498 m/z correspondente à molécula dimerizada e protonada $[2M+H]^+$. No modo de ionização negativo, (Figura XIII B) observa-se um íon em 447,22168 m/z , correspondente à molécula formando um aduto com o íon formiato (massa = 44,998201 Da) $[M-H+HCO_2H]^-$. Portanto, a massa exata da molécula é 402,20424 Da ($C_{23}H_{30}O_6$).

Figura XIII. Espectros de massas em modo positivo (A) e em modo negativo (B) do extrato X12.

O valor de massa exata da molécula determinado experimentalmente (402,20424) foi empregado como critério de busca no Dictionary of Natural Products (DNP), junto com o um valor máximo de absorção do UV superior a 380nm. O DNP é um banco de dados que abrange 170.000 substâncias naturais com informações estruturadas sobre estas, que inclui dados descritivos e numéricos sobre propriedades físicas e biológicas dos compostos, nomes sistemáticos e comuns, referências bibliográficas, diagramas de estrutura (DNP, 2015).

A busca no DNP forneceu três possíveis substâncias (Tabela VIII). Destas é possível propor a substância em questão como a Citreoviridina, a qual corresponde a um metabólito produzido por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo reportado unicamente nas espécies (*Penicillium citreo-viride*, *P. toxicarium*, *P. ochrosalmoneum* e *Aspergillus terreus*). A citreoviridina é uma micotoxina neuro e cardiotoxica que foi originalmente isolada a partir do *Penicillium citreoviridin*. A micotoxina exibe potente capacidade de inibição de ATPases mitocondriais através da inibição não competitiva da hidrólise do ATP. Esta toxina foi

descoberta no Japão por volta de 1950, sendo associada à cardiopatia beribérica e doenças neurotóxicas (ROCHA, 2013).

A terceira substância identificada no DNP (6,12,14-Trihydroxy-9-(2-oxopropyl)-5,8(14),12-abietatriene-7,11-dione) pode ser descartada baseado em que apresenta um espectro de UV diferente do obtido experimentalmente com máximos de absorção em torno de 430 nm e outro fato que descarta a possibilidade de tal metabólito ser a substância em questão é que este foi identificado unicamente na espécie vegetal *Plectranthus grandidentatus*.

Tabela VIII. Critérios de busca e resultados do Dictionary of Natural Products

Massa Exata	402.204240 Da
UV max:	>= 380nm
Hits DNP:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Citreoviridin 2. Citreoviridin C 3. 6,12,14-Trihydroxy-9-(2-oxopropyl)-5,8(14),12-abietatriene-7,11-dione

É possível observar no cromatograma UV/Vis obtido experimentalmente, que ocorre coeluição parcial de dois picos (Figura XIV) os quais provavelmente correspondem aos dois isômeros da Citreoviridina (Citreoviridina A e C), considerando que os dois picos apresentam os mesmos espectros de massas e de UV, mas com estruturas químicas diferentes de acordo com a posição orto ou para do grupamento metílico no anel lactônico em relação a cadeia alifática lateral (Figura XV).

Figura XIV. Cromatograma ampliado dos picos que coeluem no TR 13'-16' do extrato X12.

Figura XV. Estrutura química dos isômeros Citreoviridina A e Citreoviridina C.

A presença de um sistema com duplas ligações conjugadas confere à molécula capacidade de absorver a radiação no UV. O espectro de UV desta substância foi reportado previamente por Sakabe et al., 1977, e está representado na Figura XVI, o qual demonstra concordância com o espectro de UV obtido experimentalmente para esta substância (Figura XVII).

Figura XVI. Espectro UV da citreoviridina relatado por Sakabe et al., 1997.

Figura XVII. Espectro UV obtido pela amostra X12

6 Conclusão

Os resultados obtidos permitiram estabelecer um método de screening para seleção de fungos produtores de substâncias com potencial em absorver a radiação UVA, UVB ou ambas, com possível potencial para aplicação como filtro UV em protetores solares. O método compreendeu basicamente: (i) a escolha do meio de cultura que promova o crescimento dos fungos sem interferir ou interfira o mínimo possível na determinação do espectro de absorção dos extratos obtidos; (ii) o estabelecimento de um procedimento rápido e simples para extração e concentração dos extratos; (iii) a avaliação do potencial de absorção dos extratos na região do UV por análise do perfil espectrofotométrico e pelo cálculo da área sob a curva de absorção; (iv) determinação da variabilidade de produção dos compostos pelo fungo e do procedimento de extração e concentração dos extratos pela repetição de todo o processo por cinco vezes, seguido pela comparação dos perfis de absorção e os valores das áreas sob a curva calculadas; (v) análise da fotoestabilidade dos compostos dos extratos selecionados sob radiação UVA e UVB, por meio da determinação da citotoxicidade dos possíveis fotoprodutos gerados usando a medida da viabilidade celular em cultura de célula, bem como por meio da detecção de alterações dos perfis de absorção; (vi) os extratos com potencial de absorção na região do UV, fotoestáveis e não citotóxicos são submetidos à análise cromatográfica hifenada para identificação dos compostos, e (vii) após identificação dos compostos, a realização do levantamento bibliográfico pode verificar se a substância já esta descrita na literatura, se há dados como seus efeitos farmacológicos, toxicológicos entre outros.

7 Referências

AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophys.** v. 508, n. 2, p. 144-151, 2011.

AFAQ, F.; KATYAR, S. K. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** v.11, n. 14, p. 1200-1215, 2011.

AFONSO, S.; HORITA, K.; SOUSA, S. J. P.; ALMEIDA, I. F.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. A.; COSTA, P. C, MIRANDA, M. S.; ESTEVES, S. J. C.; SOUSA L., J. M. Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 36–40, 2014.

AKONDI, K. B., LAKSHMI V. V. Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. **OMICS**, v. 17, p. 61-70, 2013.

ALLEN, R. G.; M. TRESINI. 2000. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 28, p. 463– 499, 2000.

ANDERSEN, B.; KROGER, E.; ROBERTS, R. G. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. Longipes*. **Mycological Research**, v. 105, p. 291-299, 2001.

ANDERSEN, B.; NIELSEN, K. F.; THRANE, U.; SZARO, T.; TAYLOR, J.W.; JARVIS, B. B. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two new chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. **Mycologia**, v. 95, p. 1227-1238, 2003.

ANTHIS, N. J.; CLORE, G. M. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205nm. **Methods and Applications.** v.22, p.851-858, 2013.

ANVISA. Consulta Pública nº 45, de 02 de julho de 2014, publicada no D.O.U em 04 de julho de 2014. Disponível em: <[http:// portal.anvisa.gov.br /wps/wcm/connect/ 59a9320044a467c39479d5fd936af04e/Consulta+p%C3%BAblica+n+45+COFAR.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/59a9320044a467c39479d5fd936af04e/Consulta+p%C3%BAblica+n+45+COFAR.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 13/12/2014.

BAKER, S. E. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. **Medical Mycology.** v. 44, Suppl 1, p. 17-21, 2006.

BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

BARRATT, R. W.; JOHNSON, G. B.; OGATA W. N. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 52, p. 233–246, 1965.

BEADLE, G. W. & TATUM, E. L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 27, p. 499–506, 1941.

BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. 2006, 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BHADURY, P.; MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 33, p. 325-337, 2006.

BLINOVA, M. I.; YUDINTSEVA, N. M.; KALMYKOVA, N. V.; KUZMINYKH, E. V.; YURLOVA, N. A.; OVCHINMIKOVA, O. A.; POTOKIN, I. L. Effect of melanins from black yeast fungi on proliferation and differentiation of cultivated human keratinocytes and fibroblasts. **Cell Biology International**. v. 27, n. 2, p. 135-146, 2003.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1988.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. Fundamentos biotecnologia industrial. ed. 2. São Paulo: Blucher, 2008. 254 p . v.1.

BU'LOCK, J. D. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. **Advances in Applied Microbiology**. v.3, p. 293-342, 1961.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER. N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, ed. 3, p. 447-459, 2002.

CARVALHO, I. T. Microbiologia Básica. Recife: EDUFRPE, 2010. 108 p.

CASSELTON, L. ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature**. v. 3, p. 683-697, 2002.

CERVELATTI, E. P., FACHIN, A. L., FERREIRA-NOZAWA, M. S.; MARTINEZROSSI, N. M. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**. v. 44, p. 141–147, 2006.

CHEN, L.; HU, J.Y.; WANG, S.Q. The role of antioxidants in photoprotective: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 67 n. 5, p. 1013-1024, 2012.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

COUTEAU, C.; FAURE, A.; FORTIN, J.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Study of the photostability of 18 sunscreens in creams by measuring the SPF in vitro. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 44, n.1, p. 270-273, 2007.

CREEK DJ, NIJAGAL B, KIM D-H, ROJAS F, MATTHEWS KR, BARRETT MP. Metabolomics guides rational development of a simplified cell culture medium for drug screening against *Trypanosoma brucei*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 57, p. 2768-79, 2013.

DAMIANI, E.; BASCHONG, W.; GRECI, L. UV-Filter combinations under UV-A exposure: concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. **Journal of Photochemistry Photobiology: Biology**, v. 87, p. 95–104, 2007.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 41, p. 185-201, 2014.

DNP. Dictionary of Natural Products. Online tour of the Dictionary of Natural Products. Disponível em: <http://dnp.chemnetbase.com>. Acesso em Nov. 2015.

EL-ENSHASY, Hesham A. Filamentous Fungal Cultures—Process Characteristics, Products, and Applications. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, New Technologies and Applications, v. 9, p. 225-261, 2007.

FERREIRA, P. V. (1991). Estatística experimental aplicada à agronomia. Maceió, EDUFAL, 1991. 437p.

FIGUEIREDO, S. A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* (EEEGB)**. 2013. 99 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FISHER, G. J.; Kang, S.; Varani, J.; Bata-Csorgo, Z.; Wan, Y.; Datta, S.; Voorhees, J. J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**. v. 138, p. 1462-1470, 2002.

FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 58, p. 133-138, 2008.

FOX, E. M.; HOWLET, B. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**. v.11, p. 481-487, 2008.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological research**. v. 112, p. 231-240, 2008.

FUJISHIMA, A.; RAO, T. N.; TRYK, D. A. Titanium dioxide photocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Review**. v. 1, p. 1-21, 2000.

GASPARRO, F.P.; MITCHINICK, M.; NASH, J.F. A review of sunscreen safety and efficacy. **Photochemistry and Photobiology**. v. 68, n. 3, p. 243-256, 1998.

GEIS, P.; SZANISZLO, P. Carotenoid Pigments of the Dematiaceous Fungus *Wangiella dermatitidis*. **Mycologia**. v. 76, 268-273, 1984.

GIDDINGS, L-A.; NEWMAN, D. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 40, p.1181-210, 2013.

GONZALÉZ, S.; LORENTE, F-; CALZADA, Y. G-. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**. v.26, n.6, p. 614-626, 2008.

GRIFFITHS, D.; UCHIYAMA, M.; NURSE, P.; WANG, T. S. A novel mutant allele of the chromatin-bound fission yeast checkpoint protein Rad17 separates the DNA structure checkpoints. **Journal of Cell Science**. v.113, p. 1075-88, 2000.

GROTEWOLDE, E. Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. **Trends plant Science**. v.10, n. 2, p. 57-62, 2005.

GRUIJL, F. R.; VAN KRANEN, H. J.; MULLENDERS, L. H. UV- induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 63, p.19-27, 2001.

GUIMARAES, D. O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaios antibiótico no modelo de infecções em *Caenorhabditis elegans***.2009. 186f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GURR, J.- R.; WANG, A. S. S.; CHEN, C.- H.; JAN, K.- Y. Ultrafine titanium particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**. v. 213, p.66-73, 2005.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology and Medicine**. v.41, p.1205-1212, 2006.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. **Mycological Research**. v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Tripartite Guideline. Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R5), 2011.

IKEHATA, H.; ONO, T. Mechanisms of UV mutagenesis. **Journal of Radiation Research**. v.52, p.115-125, 2011.

JIANG, S. J.; CHENA, J. Y; LUA, Z. F.; YAOC, J.; CHED, D.F.; ZHOU, X.Z. Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. **Journal of Dermatological Science**, v.44, p. 29-36, 2006.

JING, L.; XU, Z.; SHANG, J.; CAI, W. The surface properties and photocatalytic activities of ZnO ultrafine particles. **Applied Surface Science**. v. 180, p. 308-314, 2001.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; KIM, Y-, H.; KANG, S. M.; LEE, J.- H.; LEE, J. I-. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 440-447, 2011.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**. v. 94, n.4, p. 550-557, 2006.

KATIYAR, S. K.; PEREZ, A.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. **Clinical Cancer Research**. v. 6, p.3864-3869, 2000.

KATIYAR S. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: onhibition of oxidative stress and protection of immune system. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 52 (Suppl 1): S71–6, 2008.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, p. 937- 947, 2005

KLEINMAN, M. H.; SMITH, M. D.; KURALI, E.; KLEINPETER, S.; JIANG, K.; ZHANG, Y.; KENNEDY-GABB, S. A.; LYNCH, A. M.; GEDDES, C. D. An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 58, p. 224-232, 2010.

KOSTOVA, A. T. D-. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms. **Planta Medica**. v. 74, n.13, p. 1548-1549, 2008.

KOTWAL, S.; R. L. PARATE, R. L.; MANE, S. S.; DESHMUKH, V. V. Influence of nutrition and different physical parameters on growth and sporulation of metarhizium anisopliae. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 1, n. 5, p. 479 – 484, 2012.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of the oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**. v. 711, n.1-2, p.193-201, 2011.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal of the American Academy Dermatology**. v. 52, n. 6; p. 937-958, 2005.

LACAZ, CARLOS DA SILVA; MINAMI, PAULO; PURCHIO, ADHEMAR. O Grande Mundo dos Fungos. São Paulo: Polígono,1970.

LARSSON, J.; GOTTFRIES, J.; BOHLIN, L.; BACKLUND, A. Expanding the Chem GPS chemical space with natural products. **Journal of Natural Products**. v. 68, p. 985-991, 2005.

LEE, Y. K.; CHA, H. J.; HONG, M.; YOON, Y.; LEE, H.; et al. Role of NF- κ B-p53 crosstalk in ultraviolet A-induced cell death and G1 arrest in human dermal fibroblasts. **Archives of Dermatological Research**. v 304, p. 73-79, 2012.

LANGE, L.; BECH, L.; BUSK, P. K.; GRELL, M. N.; HUANG, Y.; LANGE, M.; LINDE, T.; PILGAARD, B.; ROTH, D.; TONG, X. The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy. **IMA Fungus**. v. 5, n. 2, p. 463–471, 2014.

LOPES, M. F.; CRUZ, O. R.; BATISTA, A. K. Radiação ultravioleta e ativos utilizados nas formulações de protetores solares. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 183-199, 2012.

LUQUE, E. M.; GUTIÉRREZ, G.; NAVARRO-SAMPEDRO, L.; OLMEDO, M.; ROMERO, J. R.; HERREROS, C. R.; TAGUA, V. G.; CORROCHANO, L. M. A relationship between carotenoid accumulation and the distribution of species of the fungus *Neurospora* in Spain. **Plos One**. V. 7, n. 3, 2012.

LYNCH, A. M.; WILCOX, P. Review of the performance of the 3T3 NRU in vitro phototoxicity assay in the pharmaceutical industry. **Experimental and Toxicology Pathology**. v. 63, p. 209-214, 2009.

MATEUS, R. P.; CERON, C. R.; MACHADO, L. P. B.; SENE, F. M. Caracterização Preliminar do espaçador Interno Transcrito ITS-1 do DNA Ribossômico nas espécies do *cluster buzzatii* de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Ambiência**. v. 2, p. 90-96, 2006.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. 68f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2012.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi –Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177-85, 2008.

MOLINÉ, M. (2010). **Produccion de compuestos fotoprotectores (carotenoides y micosporinas) por leveduras**. Tese (Doutorado). Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, 2010.

NAIME, M. F. **Isolamento de fungos com atividade nematofágica em solo paranaense**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas e do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

NASH, J. F, TANNER, P. R. Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. v.30, n. 2-3. p. 88-95, 2014.

NAYLOR, E.C.; WATSON, R.E.B.; SHERRATT, M.J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**. v. 69, p. 249-256, 2011.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural Products**. v.70 n.3 p.461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as source of news drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75, p 311-35, 2012.

NICHOLS, J. A.; KATYIAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**. v. 302, n.2, p.1-19, 2010.

OLIVEIRA, I; BAPTISTA, P; PEREIRA, J.A; BENTO,A; LINO-NETO,T. Aplicação de métodos moleculares na avaliação da diversidade de fungos entomopatogênicos da traça da oliveira; Curso Análise de Genética Molecular - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal, 2011.

PALM, M.D.; O'DONOGHUE, M.N. Update on photoprotection. **Dermatology Therapy**. v. 20, p. 360–376, 2007.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 189-259, 2004.

PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D. Biochemical Thecniques for Filamentous Fungi. 1. ed. UK: Cab International, 136 p., 1994.

PELÁEZ, F. Biological activities of fungi. In: An Z (ed), *Handbook of Industrial Mycology*. Marcel Dekker, New York, p.49-92, 2005.

PEREIRA, L J. R.; LACERDA, R.; MAINIER, F. B. Confiabilidade metrológica da composição de misturas gasosas de gás natural comercializados como padrões no Mercado nacional. In: SIMPEP, XII, 2006. Bauru-São Paulo.

PERTSEMLIDIS, A.; FONDON, J.W. 3rd Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLAST phemy). **Genome Biology**. v. 2, n.10, 2002.

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnhology**. v.31, n. 1, 2013.

RAI, R.; SRINIVAS, R. C. Photoprotection. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**. v.73, n. 2, p. 73-79, 2007.

RAMPAUL, A.; PARKIN, I. P.; CRAMER, L. P.; Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 191, n.2-3, p. 138-148, 2007.

REDON, C.; DICKEY, J. S.; NAKAMURA, A.; KAREVA, I.; NAF, D.; NOWSHEEN, S.; KRYSTON,T. B.; BONNER, W. M. GEORGAKILAS, A. G.; SEDELNIKOVA, O. A. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.107, p. 17992-17997, 2010.

RIQUELME, M. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. **The Annual Reviews of Microbiology**. v. 67, p. 587-609, 2013.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 26, p.156 – 160, 2001.

ROCHA, M. W. **Produção, purificação e caracterização espectrométrica da micotoxina citreoviridina produzida pelo penicillium citreonigrum em meio de cultura yes (yeast extract sucrose)**. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, 2013.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreen: An overview and update. **Journal of American Academy Dermatology**. v. 64, n.2, p.748-758, 2011.

SCHIAVE, L. A. **Variabilidade na tolerância a radiação UVB de células melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e linhagens *Cryptococcus laurentii***. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products. **Inorganica Chimica Acta**. v. 360, p.794-802, 2007.

SHARMA, S; RUSTGI, S; BAYLAN H.S.; GUPTA, P.K. Internal transcribed spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with ITS sequences in common wheat - **Barley Genetics Newsletter**. v. 32, p. 38-45, 2000.

SILVA, A. R.; CECON, P. R.; RÊGO, E. R.; NASCIMENTO, M. Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteiras. **Revista Ceres, Viçosa**. v. 58, n. 2, p. 168-171, 2011.

SINHA, R. P.; SINGH, S. P.; HAIDER, D. P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 89, p. 29–35, 2007.

STERNER O. Toxic terpenoids from higher fungi and their possible role in chemical defence systems. **Cryptogamie, Mycologie**. v. 16, p. 47-57, 1995.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E. 2009. Essentials of Glycobiology. 2 ed. Nova York: Cold Spring Harbor, 2009. 800 p.

- VELMURUGAN, P.; LEE, Y. H.; VENIL, C. K; LAKSHMANAPERUMALSAMY P.; CHAE, J-. C.; OH, B-. T. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 109, n. 4, p. 346-350, 2010.
- VIEIRA, H. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e Validação da Técnica de Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ELL-PBT) Para Piretróides em Água e Análise por CG. **Química Nova**. v. 30, p. 535-540, 2007.
- VILLAS-BÔAS, S.G.; HOJER-PEDERSEN, J.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Global metabolite analysis of yeasts: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**. v.22, p.1155-1169, 2005.
- VYAS, B. R. M.; MOLITORIS, H. P. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. **Applied Environmental Microbiology**. v. 61, p. 3919-3927, 1995.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. 2007. Introduction to Fungi: Cambridge University Press, New York, 2007. 2007.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA. p.315-322, 1990.
- WONDRAK, G. T.; JACOBSON, M. K.; JACOBSON, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v.5, p. 215-237, 2005.
- XIAO, W. Advances in NF-κB signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**. v. 1, p. 425-433, 2004.
- YU, J-H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**. v. 43, p. 437-458, 2005.
- ZHU, F.; QIN, C.; TAO, L.; LIU, X.; SHI, Z.; MA, X.; JIA, J.; TAN, Y.; CUI, C.; LIN, J.; TAN, C.; JIANG, Y.; CHEN, Y. Clustered patterns of species origins of nature derived drugs and clues for future bioprospecting. **Proceedings of the Natinal Academy of Sciences**. v. 108, p. 12943-8, 2011.
- ZIMMERMANN, C. A. Avaliação da ação de filmes derivados de o-carboximetilquitosana sobre o crescimento microbiano. 2013, 83 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí, 2013.