



## Atividade antimicrobiana produzida por fungos filamentosos isolados das águas do Baixo Rio Tapajós, Pará, Brasil

Antimicrobial activity produced by filamentous fungi isolated from the waters of the Lower Tapajós River, Pará, Brazil

V. S. Bentes<sup>1\*</sup>; M. D. F. Santana<sup>2</sup>; G. S. T. Fernandes<sup>3</sup>; T. T. Santos<sup>4</sup>; E. S. M. Canto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas, Laboratório de Micologia e Bioensaios, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68040-255, Santarém-Pará, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas, Laboratório de Fisiologia Vegetal e Crescimento de Plantas, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68040-255, Santarém-Pará, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68040-255, Santarém-Pará, Brasil.

<sup>4</sup>Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães, Universidade Federal do Oeste da Bahia, 47850-000, Luis Eduardo Magalhães-Bahia, Brasil.

\*biovanessabentes@gmail.com

(Recebido em 30 de março de 2023; aceito em 04 de julho de 2023)

Estudos em ambientes aquáticos amazônicos são incipientes, no que se refere à investigação de antimicrobianos produzidos por fungos filamentosos. Este trabalho avaliou qualitativamente o potencial antimicrobiano de fungos da Bacia do Baixo Rio Tapajós, Pará, Brasil. A coleta foi realizada em diferentes pontos da Bacia do Baixo Rio Tapajós, de onde foram selecionados quinze fungos. As cepas foram submetidas à fermentação em meio de cultura Caldo Batata Dextrose e filtradas após 15 dias de incubação. Utilizando o método *Cup Plate*, foram adicionadas alíquotas de 100 µL do caldo bruto em poços (6 mm de diâmetro) perfurados em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio para cultivo específico das cepas ATCC utilizadas nos testes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 60193). Para validação da técnica, foram utilizados como controle positivo os antibióticos comerciais específicos contra as bactérias, assim como para a levedura. Para controle negativo, utilizou-se o solvente da solução padrão, sem adição dos antibióticos utilizados contra as cepas testadas. *Aspergillus* sp. BBRT 01 se destacou por apresentar ação antimicrobiana para as três cepas de micro-organismos testadas, além dessa, *Paecilomyces* sp. BBRT 11, *Penicillium* sp. BBRT 12 e *Penicillium* sp. BBRT 13 apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus*. *Fusarium* sp. BBRT 09 apresentou atividade contra *C. albicans* e *S. aureus*. Diante dos resultados, salienta-se que os fungos filamentosos da Bacia do Baixo Rio Tapajós apresentaram potencial para bioprospectar substâncias bioativas e representam um horizonte para as pesquisas envolvendo os rios amazônicos.

Palavras-chave: fungos de água doce, prospecção, substâncias biotecnológicas.

Studies in Amazonian aquatic environments are incipient regarding the investigation of antimicrobials produced by filamentous fungi. This study qualitatively assessed the antimicrobial potential of fungi from the Lower Tapajós River Basin, Pará, Brazil. The collection was conducted at various points in the Lower Tapajós River Basin, from which fifteen fungi were selected. The strains were subjected to fermentation in Potato Dextrose Broth culture medium and filtered after 15 days of incubation. Using the *Cup Plate* method, aliquots of 100 µL of the crude broth were added to wells (6 mm in diameter) drilled into Petri dishes (90 mm in diameter) containing specific culture medium for the ATCC strains used in the tests (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Candida albicans* ATCC 60193). For technique validation, specific commercial antibiotics against the bacteria, as well as for the yeast, were used as positive controls. As a negative control, the solvent of the standard solution was used without the addition of the antibiotics used against the tested strains. *Aspergillus* sp. BBRT 01 stood out for exhibiting antimicrobial activity against all three tested microorganism strains. Additionally, *Paecilomyces* sp. BBRT 11, *Penicillium* sp. BBRT 12, and *Penicillium* sp. BBRT 13 demonstrated antimicrobial action against *S. aureus*. *Fusarium* sp. BBRT 09 displayed activity against *C. albicans* and *S. aureus*. In light of the results, it is noteworthy that filamentous fungi from the Lower Tapajós River Basin exhibited potential for bioprospecting bioactive substances and represent a horizon for research involving the Amazonian rivers.

Keywords: freshwater fungi, prospecting, biotechnological substances.

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1929, Alexander Fleming fez uma das mais promissoras descobertas na área da saúde, uma potente substância antibiótica proveniente do fungo *Penicillium notatum* Westling, nomeada de Penicilina [1, 2]. Desde então, os antibióticos naturais são comumente utilizados contra infecções causadas por micro-organismos, tanto em organismos humanos, demais animais e plantas [3-5]. Na área biotecnológica, os antibióticos se destacam por sua importância econômica e sua variedade [6] na medicina moderna, a antibioticoterapia se tornou essencial, porém, seu uso indiscriminado fez emergir um alerta relacionado à resistência microbiana aos fármacos, através de fatores como sua prescrição inadequada ou automedicação [7]. Dessa forma, mecanismos de resistência podem causar inúmeras alterações na homeostasia de um organismo, podendo desequilibrá-lo de formas simples e complexas [8].

Os poucos estudos relacionados ao desenvolvimento de novos antibióticos frente ao crescimento exponencial de micro-organismos resistentes vêm se tornando um problema de saúde pública [9]. No Brasil, o órgão responsável pelo controle de venda e uso de antibióticos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que por meio da Resolução RDC N° 471, 23 de fevereiro de 2021, dispõe sobre a prescrição desses fármacos, desde critérios de dispensação medicamentosa até controle de uso de substâncias antibióticas a fim de garantir a fiscalização e o uso desses medicamentos [10]. Da mesma forma, este órgão possui diretrizes que visam à elaboração e aplicação de programas de gerenciamento do uso de agentes antimicrobianos [11] a fim de combater a Resistência Antimicrobiana (RAM) por meio de recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), dispostos no documento chamado *Global Antimicrobial Surveillance System* (GLASS) [12].

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), estima-se que até 2050 todos os antibióticos comumente utilizados perderão totalmente sua eficácia, causando cerca de 10 milhões de óbitos por ano decorrente de RAM. Do ponto de vista econômico, países subdesenvolvidos como o Brasil, e outros com menos acesso a inovações tecnológicas, serão os mais afetados futuramente [13, 14], gerando preocupação nas esferas de órgãos públicos, indústrias ligadas a produção de fármacos e à comunidade científica global [15]. Assim, há uma demanda crescente de investimentos e inovação em pesquisas que buscam novas formas de controlar agentes patogênicos, dado o aumento significativo de micro-organismos que adquirem resistência e limitam a ação dos fármacos atuais [16].

Nesse sentido, há diversas pesquisas voltadas para a prospecção de fungos produtores de compostos naturais mais eficientes no controle de infecções, os quais podem compreender desde o uso de cogumelos, até fungos microscópicos, como os endofíticos e os encontrados no solo [17-19]. Na Amazônia brasileira, região norte do país, os estudos ainda são incipientes e os esforços em desvendar metabólitos produzidos por espécies fúngicas são necessários, especialmente em ambientes aquáticos, principalmente os de água doce [20, 21], para os quais a literatura ainda é rara. Além disso, estudos em áreas pouco exploradas são de grande relevância, pois revelam inúmeras espécies que podem apresentar bioativos ainda não descobertos [22].

Compostos secundários são utilizados como reguladores, promotores de crescimento e indutores de resistência [23], são substâncias produzidas principalmente por fungos filamentosos após o primeiro momento de crescimento micelial, que moldam ativamente suas interações com outros organismos e com o ambiente [24]. Dos fungos produtores de metabólitos secundários mais conhecidos pode-se listar *Acremonium* Link, *Aspergillus niger* Tiegh, *Aspergillus parasiticus* Speare, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, *Cephalosporium* Corda, *Micromonospora* Orskov, *Monascus purpureus* Went, *Penicillium griseofulvum* Dierckx, *Streptomyces* Waksman & Henrici e *Tolypocladium inflatum* W. Gams com diversas aplicações no mercado, desde indústria alimentícia à farmacêutica [25]. Os metabólitos secundários são fontes renováveis para a saúde por meio da descoberta de novas substâncias e podem ser alternativas mais eficazes considerando os antibióticos já utilizados. Diante disto, este trabalho investigou a atividade antimicrobiana de fungos filamentosos isolados das águas da Bacia do Baixo Rio Tapajós, no Pará, visto que, estudos em ambientes aquáticos amazônicos são incipientes no que se refere à diversidade fúngica e investigação de compostos bioativos produzidos por fungos que ocorrem nestes ambientes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de coleta das amostras de água

Esta pesquisa foi conduzida em localidades da Bacia do Baixo Rio Tapajós, região oeste do estado do Pará, Brasil com o apoio da expedição do projeto Águas do Tapajós da *The Nature Conservancy* (TNC) com a Universidade Federal do Oeste do Pará. Os pontos de amostragem foram: Parauá (02°50'08,2"S; 055°10'13,7"W), Surucuaá (02°42'17,3"S; 055°10'09,8"W), Cametá (03°27'7,1"S; 055°21'55,1"W), Apacê (03°30'30,9"S; 055°21'56,0"W), Cauaçu-Epá (03°50'26,2"S; 055°32'26,3"W), Barreiras (04°06'56,5"S; 055°41'11,2"W), Santarenzinho (04°10'15,6"S; 055°50'16,5"W) e Itaituba (04°16'69,8"S; 055°59'13,6"W) (Figura 1) em novembro de 2020, junho e setembro de 2021.

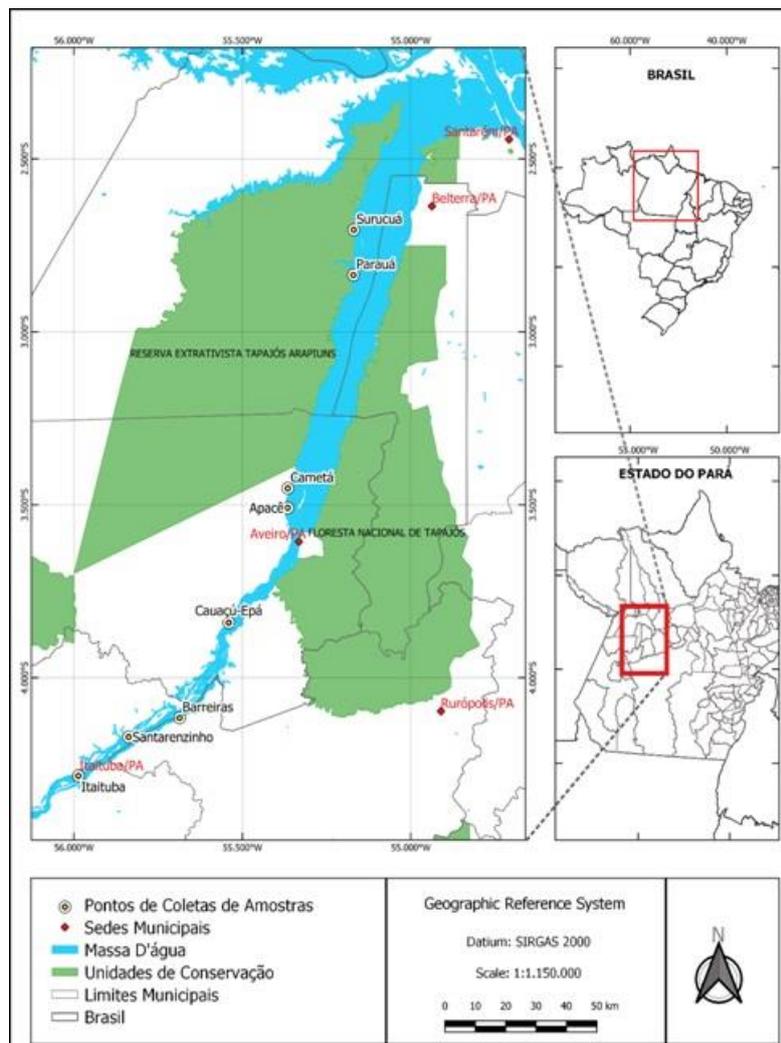


Figura 1: Mapa de localização dos pontos de coleta de amostras de água na Bacia do Baixo Rio Tapajós.

### 2.2 Triagem e isolamento dos fungos

As amostras de água foram coletadas manualmente em frascos de vidro (100 mL) do tipo âmbar previamente esterilizados a 121°C, durante 30 minutos. Foram inseridos à profundidade entre 15 cm e 30 cm. Mantidos sob refrigeração entre 1°C e 4°C em caixa térmica de isopor com gelo e transportados para o Laboratório de Ensino Multidisciplinar em Biologia Aplicada (LABIO) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). As amostras foram submetidas à

técnica de diluição seriada, onde uma alíquota de 500 µl das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram plaqueadas em placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (Kasvi) (BDA – 39g/L) acrescido de cloranfenicol (0,05g/L) e Extrato de Malte Ágar (MEA - extrato de malte 30g/L, peptona micológica 5g/L e ágar 15g/L).

### 2.3 Identificação morfológica dos isolados.

A identificação taxonômica ocorreu através da observação de aspectos macroscópicos e microscópicos das colônias. Seus caracteres visuais marcantes foram analisados como critério de identificação taxonômica: textura, topologia, elevação, margem e, em alguns casos, a pigmentação da colônia e mudanças de coloração no meio de cultivo, de acordo com a literatura especializada. Para identificação microscópica, os isolados fúngicos foram submetidos à técnica de microscopia com observação óptica de suas estruturas morfológicas, com auxílio da técnica de lâmina em microcultivo com adição de corante azul de algodão utilizadas nas observações em microscópio óptico *Primo Star* (Zeiss) nas objetivas de 40x e 100x.

Quinze cepas foram selecionadas a partir das observações de suas características morfológicas, considerando o crescimento mais acelerado em meio de cultura. As cepas foram purificadas em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA por sete dias à 26 °C em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.).

### 2.4 Padronização dos inóculos das cepas fúngicas para fermentação

Para o preparo do inóculo, os isolados foram repicados em BDA à 30°C, após três dias de crescimento houve a raspagem das colônias com auxílio de um bisturi, os resíduos provenientes das raspagens foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada à 0,85% esta suspensão resultante foi agitada e homogeneizada em agitador orbital durante 15 segundos. Foi colocado 10 µl da suspensão em câmara de Neubauer e em seguida realizada a leitura de três quadrados aleatórios do quadrante central, por meio dessa contagem em microscópio óptico foi possível observar e contabilizar o número de células fúngicas, através dessa informação pode-se saber quanto seria necessário retirar da suspensão para obter uma solução final de  $5 \times 10^4$ /mL.

Esta suspensão com número de células quantificado foi inoculada e submetida ao processo de fermentação por 15 dias em meio líquido Caldo Batata Dextrose (CBD - batata 120g/L e dextrose 10g/L). Utilizou-se 50 mL de meio CBD distribuídos em Erlenmeyer de 125 mL onde os quinze fungos testados foram incubados, em caixa térmica de isopor vedada, nas condições estáticas, na ausência de luz e em temperatura ambiente. Após esse período o caldo metabólito foi filtrado utilizando papel filtro Whatman nº4 por meio de filtração à vácuo em Kitassato e funil de Buchner.

### 2.5 Cepas padrão utilizadas

Foram utilizadas para avaliação antimicrobiana duas cepas patogênicas bacterianas e uma cepa patogênica fúngica, respectivamente: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativa) e *Candida albicans* ATCC 60193 (Gram positiva). Reativadas 24 horas previamente à sua utilização. As bactérias foram repicadas em meio Müeller Hinton Ágar (MHA) a 37°C por 12 horas, e a levedura em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) a 30°C por 48 horas.

### 2.6 Padronização das cepas testes ATCC

A padronização das cepas testes ATCC foi realizada pelo método de suspensão direta das colônias, conforme as normas do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). O inóculo foi preparado por meio de uma suspensão em solução salina esterilizada (0,85%) de colônias

isoladas numa placa de Petri (90 mm de diâmetro) com 18 a 24 horas de crescimento, com ajuste da suspensão para que sua turbidez esteja de acordo com o padrão MacFarland de 0,5.

Utilizou-se um homogeneizador orbital para homogeneizar a suspensão celular, para processamento em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm, com absorvância variando entre 0,08 e 0,1 para cepa bacteriana e comprimento de onda 530nm e absorvância de 0,5 a 0,12 para cepa fúngica. Após a padronização, foi semeado 100µL da suspensão celular das bactérias em meio de cultivo MHA e 100µL da suspensão da cepa fúngica em meio de cultivo SDA, ambos contendo camada de meio de 4 mm de espessura.

## 2.7 Determinação da atividade antimicrobiana

O método de difusão em ágar por poços (*Cup plate*) foi realizado conforme CLSI (2012), (EUA: norma M02-A11, Padrões de Desempenho Antimicrobiano para Testes de Sensibilidade em disco) com modificações.

Com um *swab* estéril foi semeado na superfície do ágar as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* com o objetivo de haver crescimento em toda a superfície do meio em placa, posteriormente foram perfurados poços de aproximadamente 6 mm de diâmetro no meio de cultura, onde foram adicionadas alíquotas de 100µL do filtrado de cultura dos fungos, 50 µL do controle positivo e 100 µL controle negativo.

Para o controle positivo de formação do halo de inibição, que se trata de um fármaco convencional que apresente atividade antimicrobiana para as cepas testes, foram utilizados Ceftriaxona (30µg) para *S. aureus*, Amoxicilina (10µg) para *E. coli* e Fluconazol (25µg) para *C. albicans*.

Para o controle negativo, foram utilizados os solventes de cada droga convencional utilizada, mas sem a adição do antibiótico de acordo com as normas preconizadas. Ao final, as placas de Petri foram acondicionadas em incubadora B.O.D. a 37°C por 12 horas para bactérias e à 30°C por 48 horas para levedura para posterior leitura.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado, quinze fungos filamentosos isolados das amostras de água da Bacia do Baixo Rio Tapajós, foram identificados morfológicamente e classificados de acordo com a taxonomia ao nível de gênero.

Foi utilizado um código de identificação contendo o gênero seguido de, sp., BBRT (Bacia do Baixo Rio Tapajós) seguido da numeração. São eles, *Acremonium* sp. BBRT 00, *Aspergillus* sp. BBRT 01, *Aspergillus* sp. BBRT 02, *Aspergillus* sp. BBRT 03, *Aspergillus* sp. BBRT 04, *Cladosporium* sp. BBRT 05, *Cladosporium* sp. BBRT 06, *Colletotrichum* sp. BBRT 07, *Curvularia* sp. BBRT 08, *Fusarium* sp. BBRT 09, *Mycelia sterilia* sp. BBRT 10, *Paecilomyces* sp. BBRT 11, *Penicillium* sp. BBRT 12, *Penicillium* sp. BBRT 13 e *Talaromyces* sp. BBRT 14 (Figura 2).

Entre estes, dez fungos apresentaram halos de inibição positivos contra os micro-organismos testados na avaliação preliminar (Tabela 1).

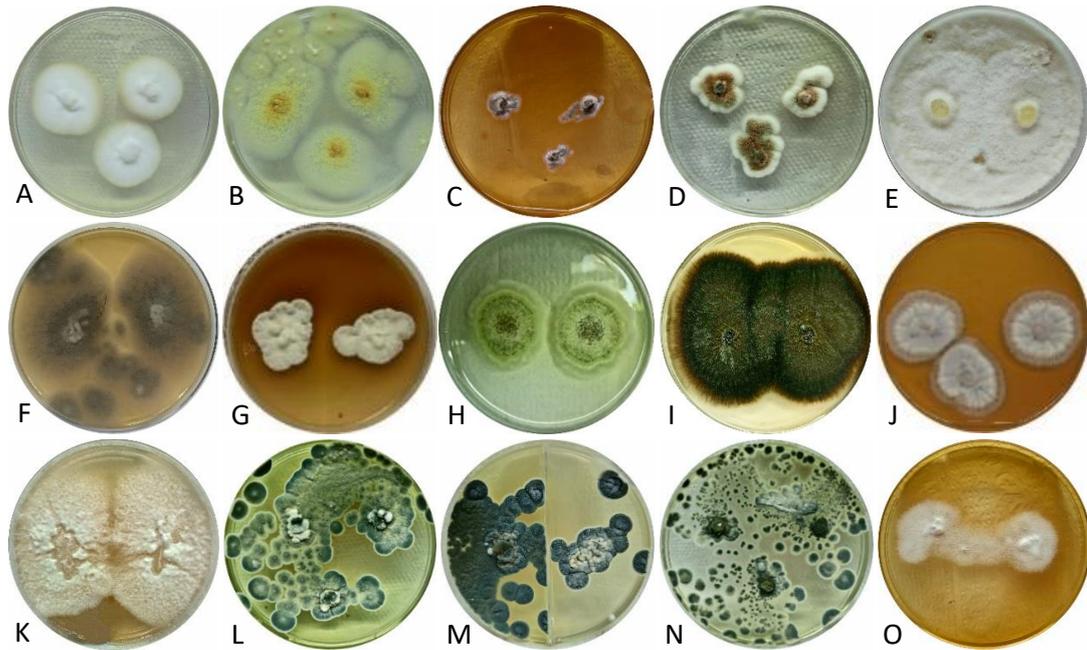


Figura 2: Morfologia dos fungos filamentosos isolados das águas da Bacia do Baixo Rio Tapajós, Pará, Brasil em meio de cultura MEA e BDA após 7 dias de incubação a 26°C. (A) *Acremonium* sp. BBRT 00. (B – E) *Aspergillus* sp. BBRT 01, 02, 03 e 04. (F – G) *Cladosporium* sp. BBRT 05 e 06. (H) *Colletotrichum* sp. BBRT 07. (I) *Curvularia* sp. BBRT 08. (J) *Fusarium* sp. BBRT 09. (K) *Mycelia sterilia* sp. BBRT 10. (L) *Paecilomyces* sp. BBRT 11. (M – N) *Penicillium* sp. BBRT 12 e 13. (O) *Talaromyces* sp. BBRT 14.

Tabela 1: Triagem de quinze isolados fúngicos para o teste de determinação de atividade antimicrobiana.

TÁXON	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	ATCC 60193	ATCC 25922	ATCC 25923
<i>Acremonium</i> sp. BBRT 00	+	-	+
<i>Aspergillus</i> sp. BBRT 01	+	-	-
<i>Aspergillus</i> sp. BBRT 02	-	+	-
<i>Aspergillus</i> sp. BBRT 03	+	-	-
<i>Aspergillus</i> sp. BBRT 04	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. BBRT 05	+	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. BBRT 06	+	+	-
<i>Colletotrichum</i> sp. BBRT 07	-	-	-
<i>Curvularia</i> sp. BBRT 08	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp. BBRT 09	+	-	+
<i>Mycelia sterilia</i> sp. BBRT 10	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp. BBRT 11	+	-	+
<i>Penicillium</i> sp. BBRT 12	-	-	+
<i>Penicillium</i> sp. BBRT 13	-	-	+
<i>Talaromyces</i> sp. BBRT 14	-	-	-

Com base nos resultados preliminares expostos na Tabela 1, foi realizado um novo teste de atividade antimicrobiana com os caldos metabólitos positivos para inibição do crescimento. Como resultado do ensaio de difusão em poços, seis dos caldos metabólitos demonstraram atividade

inibitória contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Com halos de inibição variando entre 8,91 a 9,85 mm de diâmetro para *E. coli*. Entre 10,5 a 24,13 mm de diâmetro para *S. aureus* e entre 15,43 a 21,3 mm de diâmetro para a cepa *C. albicans* (Tabela 2). A leitura foi realizada após 24 horas e 48 horas para a levedura testada, e a leitura para as bactérias testadas foram realizadas em 16 horas e 18 horas conforme as normas da CLSI (Figura 3).

Tabela 2. Média dos halos de inibição em (mm em diâmetro) dos caldos metabólitos.

TÁXON	Halos de inibição (mm em diâmetro) do caldo bruto		
	Cepas teste		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Aspergillus</i> sp. BBRT 01	15,43 ± 0,60	9,85 ± 0,68	10,5 ± 0,23
<i>Aspergillus</i> sp. BBRT 02	-	8,91 ± 0,33	-
<i>Fusarium</i> sp. BBRT 09	21,3 ± 2,63	-	18,03 ± 3,13
<i>Paecilomyces</i> sp. BBRT 11	-	-	24,13 ± 2,01
<i>Penicillium</i> sp. BBRT 12	-	-	20,43 ± 2,54
<i>Penicillium</i> sp. BBRT 13	-	-	19,3 ± 3,03
<b>Controle Positivo</b>	26,55 ± 1,66 (Flu*)	22,41 ± 1,03 (Amox*)	33,85 ± 2,04 (Ceft*)
<b>Controle Negativo</b>	- (AD*)	- (TF*)	- (AD)

AD\* = Água Destilada

TF\*\* = Tampão Fosfato.

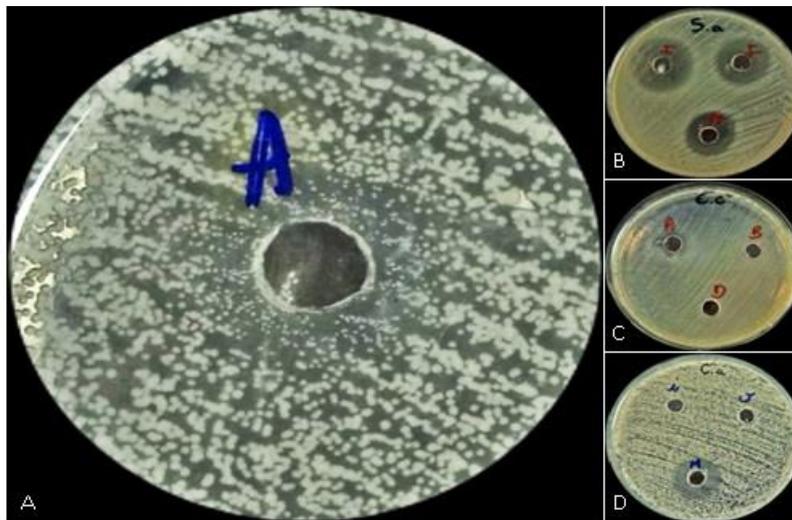


Figura 3: Halos de inibição dos extratos testados pelo método de difusão em poços. (A) *Aspergillus* sp. BBRT 01 colônia "a" contra *C. albicans*, formando um halo com subpopulações de leveduras (Potencial fungistático). (B) Halos de inibição contra *S. aureus* colônia "m" *Fusarium* sp. BBRT 09, colônia "i" *Paecilomyces* sp. BBRT 11 e colônia "j" *Penicillium* sp. BBRT 12. (C) Halo de inibição contra *E. coli*, colônia "a" *Aspergillus* sp. BBRT 01. (D) Halo de inibição contra *C. albicans*, colônia "m" *Fusarium* sp. BBRT 09.

Por meio da técnica de difusão em poços, verificou-se que seis caldos metabólitos apresentaram atividade antimicrobiana para pelo menos um micro-organismo testado. Wang et al., (2021) em seu trabalho relata o grande potencial de fungos em ambientes aquáticos como fontes significativas de antimicrobianos, com 272 biativos descritos na literatura desde 1998 a 2019 [26].

O gênero *Aspergillus* sp. BBRT 01 destacou-se por apresentar atividade de inibição do crescimento contra as três cepas ATCC testadas, no entanto para *C. albicans* demonstrou atividade fungistática. Estudos com fungos isolados de amostras de água doce provenientes de ambientes aquáticos amazônicos, demonstraram os extratos ativos de cinco diferentes fungos, dentre eles *Fusarium* e *Aspergillus*, que apresentaram também alto desempenho em testagens demonstrando atividade antifúngica e fungistática contra *C. albicans* [27]. No presente estudo o gênero *Aspergillus* sp. BBRT 01 apresentou atividade fungistática contra *C. albicans*, já *Fusarium* sp. BBRT 09 demonstrou atividade antifúngica para a mesma cepa. Pesquisas com o gênero *Aspergillus*, evidenciaram seu grande potencial em bioativos, por se tratar de um gênero com aproximadamente 180 espécies produtoras de compostos de interesse comercial [28] dentre estes, compostos antimicrobianos que em estudos recentes demonstram que podem ser ainda potencializados com a utilização de nanopartículas [29]. Al-Fakih & Almaqtri (2019) [30] sugerem que o gênero *Aspergillus* apresenta resultados mais satisfatórios em bactérias Gram-positivas entretanto, com base no que foi observado no presente estudo, *Aspergillus* sp. BBRT 01 e *Aspergillus* sp. BBRT 02 ambos demonstraram atividade contra *E. coli*, bactéria Gram-negativa, podendo se tratar de novas espécies do gênero que dispõem de recursos para adentrar com maior facilidade tanto em células Gram-positivas, como também células Gram-negativas. Estes estudos corroboram a notável variedade de metabólitos presentes nesses gêneros.

*Fusarium* sp. BBRT 09 apresentou atividades contra *C. albicans* (21 mm de diâmetro) e *S. aureus* (18 mm de diâmetro). Segundo uma análise do endófito *Fusarium tricinctum*, no trabalho de Tejesvi et al. (2013) [31] observou-se a produção de um peptídeo antimicrobiano, o Trtesin, o qual apresentou valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 64 µg/mL demonstrando atividade frente a cepa *C. albicans*, assim como, os resultados do presente estudo sugerem. Ratnaweera et al. (2015) [32] verificaram a atividade de fungos endofíticos de *Opuntia dillenii* e constataram que o fungo mais bioativo se tratava de *Fusarium*, mostrando que seu principal composto antimicrobiano é derivado do ácido tetrâmico [33].

Os gêneros *Paecilomyces* sp. BBRT 11, *Penicillium* sp. BBRT 12 e *Penicillium* sp. BBRT 13 apresentaram atividade somente frente a cepa *S. aureus* com halos de inibição de 24 mm, 20 mm e 19 mm de diâmetro, respectivamente. No presente estudo, os dois isolados identificados como gênero *Penicillium* não apresentaram halos de inibição contra *E. coli* ATCC 25922. Estudos no bioma amazônico ressaltam que o gênero *Penicillium* é uma fonte promissora com boas expectativas de produção de biocompostos contra cepas patogênicas [34]. Oliveira et al. (2022) [35] avaliaram o gênero *Paecilomyces* como produtor de substâncias que inibissem o crescimento da cepa *S. aureus*, observando a produção de substâncias antimicrobianas com uma média do halo de inibição de aproximadamente 18 mm de diâmetro. No presente trabalho, *Paecilomyces* demonstrou nos testes, halos de inibição com média de 24 mm para *S. aureus*, sendo este o maior diâmetro de halo registrado para este estudo.

Nos últimos dez anos, poucos registros de estudos de investigação de produção de antimicrobianos por fungos de água doce na Amazônia brasileira foram identificados [36]. O que responde a carência em investigações de novos compostos de interesse biotecnológicos voltados para a região amazônica e especialmente no que concerne aos ambientes aquáticos deste bioma.

#### 4. CONCLUSÃO

Através da metodologia utilizada os caldos metabólitos dos gêneros de microfungos filamentosos selecionados após triagem, *Aspergillus* sp. BBRT 01 e 02, *Fusarium* sp. BBRT 09, *Paecilomyces* sp. BBRT 11 e *Penicillium* sp. BBRT 11 e 12, demonstraram ser fontes de substâncias antimicrobianas e/ou substâncias fungistáticas, como é o caso de *Aspergillus* sp. BBRT 01 contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* ATCC 60193 demonstrando a capacidade de matar e inibir o crescimento de cepas bacterianas e fúngicas de interesse médico.

A levedura *Candida albicans* ATCC 60193 sofreu ação fungistática de *Aspergillus* sp. BBRT 01 e ação fungicida de *Fusarium* sp. BBRT 09, no teste de poços. A atividade antimicrobiana por difusão em ágar demonstrou a predominância de metabólitos dos fungos do Baixo Rio Tapajós

eficazes principalmente frente a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cinco deles (*Aspergillus* sp. BBRT 01, *Fusarium* sp. BBRT 09, *Paecilomyces* sp. BBRT 11, *Penicillium* sp. BBRT 12 e *Penicillium* sp. BBRT 13) dos seis que apresentaram halos de inibição, obtiveram resultados satisfatórios frente a *S. aureus*, exceto *Aspergillus* sp. BBRT 02 entretanto, este gênero foi o único a apresentar atividade contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Os caldos metabólitos dos fungos testados apresentaram ação bactericida e fungicida, baixa ação fungistática e nenhuma ação bacteriostática.

Ressalta-se que, estudos mais robustos devem ser realizados em rios de água doce da Amazônia, com o intuito de conhecer a diversidade de fungos existentes, além de prospectar novas espécies, a fim de investigar seus metabólitos secundários que podem ser aplicados no melhoramento da qualidade de vida humana.

O presente estudo demonstra a viabilidade dos rios amazônicos como fontes de micro-organismos fúngicos de interesse biotecnológico.

## 5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa do Pará (FAPESPA) pelo financiamento desta pesquisa e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Dávia Talgatti pela colaboração nas coletas realizadas através da expedição do projeto Águas do Tapajós da *The Nature Conservancy* (TNC) em parceria com a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen S. Discovery, Invention, and Innovation: Are they really different? *Acad Lett*. 2022 Jan. doi: 10.20935/AL4747
2. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*. 1929 Jun;10(3):226-36.
3. Maia PLC, Dos Santos JKG, De Barros NB, Barros RR. Pharmaceutical attention: an approach to antimicrobial resistance and improper use in everyday life. *Brazilian J Dev*. 2021 Jan. doi: 10.34117/bjdv7n4-682
4. De Souza FC, De Souza FB, Sarmiento JL, Bindá L de C. Interference of antibiotics use in the intestinal microbiota. *Brazilian J Dev*. 2022 Apr. doi: 10.34117/bjdv8n4-392
5. Ferreira M, Leão C, Clemente L, Albuquerque T, Amaro A. Antibiotic susceptibility profiles and resistance mechanisms to  $\beta$ -Lactams and polymyxins of *Escherichia coli* from broilers raised under intensive and extensive production systems. *Microorganisms*. 2022;10(10):2044. doi: 10.3390/microorganisms10102044
6. Faleiro FG, de Andrade SEM, dos Reis Junior FB. *Biocologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. Planaltina (DF): Embrapa Cerrado; 2011.
7. Smith JT, Lewin CS. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Vet Microbiol*. 1993 Jun;35(3-4):233-42. doi: 10.1016/0378-1135(93)90148-Z
8. Brito AMG, Versiani AP, Dias MTS, Piris ÁP. Uso indiscriminado de antibióticos: uma revisão integrativa. *Bionorte*. 2022 May;11(1):219-25. doi: 10.47822/bn.v11i1.245
9. Vieira PJJ, De Freitas LT. Atuação do farmacêutico na dispensação de antimicrobianos com foco na resistência bacteriana. *Brazilian J Dev*. 2021;(5):48234-44. doi: 10.34117/bjdv7n5-294
10. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução RDC nº 471, de 23 de fevereiro de 2021. Dispõe sobre os critérios para a prescrição, dispensação, controle, embalagem e rotulagem de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos de uso sob prescrição, isoladas ou em associação, listadas em Instrução Normativa específica. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-471-de-23-de-fevereiro-de-2021-304923190>
11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Diretriz nacional para elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. Brasília (DF): Anvisa; 2017. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Diretriz+Nacional+para+Elabora%C3%A7%C3%A3o+de+Programa+de+Gerenciamento+do+Uso+de+Antimicrobiano+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde/667979c2-7edc-411b-a7e0-49a6448880d4?version=1.0>

12. OMS. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). Report: 2021 [Internet]; 9 jun 201 [citado em 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>
13. Machado CDS. Resistência antimicrobiana e os impactos na sociedade. *Saúde e Desenvolv Hum.* 2021 Feb 26;9(1):1-6. doi: 10.18316/sdh.v9i1.6351
14. O’neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations the review on antimicrobial resistance. United Kingdom: Wellcome Trust; HM Government; 2016. Available from: [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final paper\\_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)
15. Oliveira M, Pereira KDS, Zamberlam CR. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: Uma questão de saúde pública. *Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências e Educação.* 2020;6(11):183-201. doi: 10.29327/4426668.
16. Miranda ICS, Vieira RMS, Souza TFMP. Consequências do uso inadequado de antibióticos: uma revisão de literatura. *Res Soc Dev.* 2022 Jun 5;11(7):1-7. doi: 10.33448/rsd-v11i7.30225
17. Carmin AA, Santiago PAL, Santiago SRSS, Gomes AMS, Pereira KDES. Avaliação do potencial antimicrobiano de fungos isolados do solo do Município de Iranduba. *Res Soc Dev.* 2021;10(4):e34010414224. doi: 10.33448/rsd-v10i4.14224
18. Rodrigues JC, Lima SW, Ribeiro SD, Maia CR, Santos GCV, Figueiredo CHD, et al. Antimicrobial Activity of *Aspergillus* sp. from the Amazon Biome: Isolation of Kojic Acid. *Int J Microbiol.* 2022 May 17;2022:1-7. doi: 10.1155/2022/4010018
19. Santiago P, Santiago S, Aquino P, Nunomura S, Nunomura R. Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos de fungos *Penicillium* spp. *Res Soc Dev.* 2022;11(3):e11511326457. doi: 10.33448/rsd-v11i3.26457
20. Canto ESM, Cortez ACA, Monteiro JS, Barbosa FR, Zelski S, Souza JVB . Composition and Diversity of Fungal Decomposers of Submerged Wood in Two Lakes in the Brazilian Amazon State of Pará. *Int J Microbiol.* 2020;2020:1-9. doi: 10.1155/2020/6582514
21. da Silva SKR, de Sousa SF, de Santana RCF. *Biociência Microbiana – Volume 1.* eBooks: Editora Científica Digital; 2023. Disponível em: <https://www.editoracientifica.com.br/books/biociencia-microbiana-volume-1>
22. Dong W, Wang B, Hyde KD, McKenzie EHC, Raja HA, Tanaka K, et al. Freshwater Dothideomycetes. *Fungal Diversity.* 2020 Nov;10(1):319-575. doi: 10.1007/s13225-020-00463-5
23. Pinheiro JB, Polonio JC, Orlandelli RC, Pamphile JA, Golias HC. Atividade larvicida de fungos endofíticos: uma revisão. *Brazilian J Dev.* 2020;6(6):35761-74. doi: 10.34117/bjdv6n6-205
24. Devi R, Kaur T, Guleria G, Rana KL, Kour D, Yadav N, et al. Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. *New Future Dev Microb Biotechnol Bioeng.* 2020;147-61. 10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7
25. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An introduction.* 13th ed. Boston (US): Pearson; 2018.
26. Wang C, Tang S, Cao S. Antimicrobial compounds from marine fungi. *Phytochem Rev.* 2021;20:85-117. doi: 10.1007/s11101-020-09705-5
27. Oliveira MR, Santiago SRSS, Katak RM, Camargo MRM, Bastos IS, Orlandi PP, et al. Atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos miceliais de fungos de ambientes aquáticos da Amazônia. *RSD.* 2021;10(10):e273101018795. doi: 10.33448/rsd-v10i10.18795
28. Elissawy AM, Ebada SS, Ashour ML, El-Neketi M, Ebrahim W, Singab ANB. New secondary metabolites from the mangrove-derived fungus *Aspergillus* sp. AV-2. *Phytochem Lett.* 2019 Feb;29:1-5. doi: 10.1016/j.phytol.2018.10.014
29. Omran BA, Nassar HN, Fatthallah NA, Hamdy A, El-Shatoury EH, El-Gendy NS. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles mycosynthesized by *Aspergillus brasiliensis*. *J Appl Microbiol.* 2018 Aug;125(2):370-82. doi: 10.1016/B978-0-12-822503-5.00011-4
30. Al-Fakih AA, Almaqtri WQA. Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. *Mycology.* 2019 Apr 22;10(4):191-209. doi: 10.1080/21501203.2019.1604576
31. Tejesvi MV, Segura DR, Schnorr KM, Sandvang D, Mattila S, Olsen PB, et al. An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Divers.* 2013 May;60(1):153-9. doi: 10.1007/s13225-013-0227-8
32. Ratnaweera PB, de Silva ED, Williams DE, Andersen RJ. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC Complement Altern Med.* 2015 Jul;15(1):220. doi: 10.1186/s12906-015-0722-4
33. Ratnaweera PB, de Silva ED. Endophytic fungi: A remarkable source of biologically active secondary metabolites. In: Maheshwari DK, Annapurna K, editores. *Endophytes: Crop Productivity and Protection.* Vol. 2. eBook: Springer Link; 2017. p. 191-212. doi: 10.1007/978-3-319-66544-3\_9

34. Batista Junior GPB, Silva KN, Santiago PAL, Santiago SRSS, Ohse KC, & Martim SR. Prospecção de enzimas e atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* isoladas do Bioma Amazônia. *Brazilian J Dev.* 2021;7(7):75011-25. doi: 10.34117/bjdv7n8-446
35. Oliveira VB, Souza AF, Lins UMBL, Andrade RFS, Campos-Takaki GM, Lima MAB. Antimicrobial potential of filamentous fungi growing on renewable substrates. *RSD.* 2022;11(11):e570111133958. doi: 10.33448/rsd-v11i11.33958
36. Garcia MAY, Vidal SV, Abreu LR, Paolucci SLJ. Potencialidades biotecnológicas dos fungos da Amazônia Brasileira: Uma revisão sistemática. *Div Journ.* 2022 Feb;7(4):2535-51. doi: 10.48017/dj.v7i4.2104