



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E
ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE CEPAS DO GÊNERO *Fusarium*

RITA DE NAZARÉ SILVA ALVES

São Luís- MA
2021

RITA DE NAZARÉ SILVA ALVES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E
ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE CEPAS DO GÊNERO *Fusarium*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Ciências aplicadas à Saúde do Adulto.

Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas e endêmicas no Maranhão.

Orientador: Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Coordenador: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís- MA

2021

Alves, Rita de Nazaré Silva.

Atividade antioxidante, antitumoral e antimicrobiana de metabólitos secundários de cepas do gênero *Fusarium* / Rita de Nazaré Silva Alves. - 2021.

82 f.

Coorientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Orientador(a): Geusa Felipa de Barros Bezerra Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Sao Luis, 2021.

1. Atividade antioxidante. 2. Atividade Biológica. 3. *Fusarium*. 4. Metabólito secundário. I. Bezerra, Geusa Felipa de Barros Bezerra. II. Nascimento, Maria do Desterro Soares Brandão. III. Título.

RITA DE NAZARÉ SILVA ALVES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E
ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE CEPAS DO GÊNERO *Fusarium*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em: 10/09/2021.

Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

**Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
(Coorientadora)**
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Luis Conrado Zaror
Universidad Austral de Chile

Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. José Eduardo Batista
Universidade Federal do Maranhão - UFMA
(Suplente)

AGRADECIMENTO

Primeiramente à Deus, pois sem Ele este trabalho não seria possível, nos momentos de fraqueza foi Ele que me deu forças;

À minha família, em especial a minha mãe Maria Santos Silva pela compreensão e amor incondicional;

A Fábio José da Silva Nascimento pelo apoio incondicional nos momentos difíceis;

À minha querida orientadora professora Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra pela credibilidade, apoio e confiança recebida;

À minha coorientadora professora Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento pela confiança e por sempre me encorajar e fazer ver a ciência da melhor forma, graças a sua paixão pelo que faz;

À minha querida amiga Kátia Regina Assunção Borges pelo apoio e incentivo constante;

Ao querido amigo Marcos Antônio pelo apoio e incentivo;

À minha grande amiga Luziane Mendes Silva pelo incentivo;

Aos professores do Departamento de Química da UFMA: Gilza Maria Piedade Prazeres, Caritas de Jesus Silva Mendonça e Marcos Bispo Pinheiro Camara pelo apoio e análise dos metabólitos secundários;

A todos do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA): Professora Dra. Ivone Garros Rosa, Walbert Edson Muniz Filho, Carlene Peixoto, Cristiane Arcângela Caldenhof, Nilson Carlos Costa de Sousa Filho, Edna Maria da Silva, Sâmia Regia Teixeira Botelho, Amanda Mara Teles, Diamantino Alves e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa;

Ao professor Dr. Marcelo de Souza Andrade e Carolina Borges Cordeiro pela valiosa contribuição na biologia molecular.

A todos os amigos da turma 18 do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto;

À Universidade Federal do Maranhão – UFMA que forneceu toda estrutura física e familiar para concretização da pesquisa;

Ao Programa de Mestrado Saúde do Adulto pelo apoio, contribuição e acolhida;

Aos professores do Programa de Mestrado Saúde do Adulto pelos ensinamentos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão – FAPEMA pelo financiamento dado através do Projeto Nº 31/2016 CEBIOMA intitulado COLEÇÃO DE FUNGOS DO MARANHAO: Biodiversidade e Sustentabilidade, que foi fundamental para a compra dos insumos e manutenção da pesquisa.

EPÍGRAFE

Os sonhos não determinam o lugar onde iremos chegar, mas produzem a força necessária para tirar-nos do lugar em que estamos.

Augusto Cury

RESUMO

Introdução: Metabólitos secundários do gênero *Fusarium* têm sido considerados como fonte produtora de moléculas bioativas contra o câncer, bactérias e fungos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antioxidante, antitumoral, antifúngica e antibacteriana dos metabólitos secundários obtidos de duas espécies do gênero *Fusarium*. **Metodologia:** Foram obtidos dois metabólitos secundários, sendo um de *Fusarium oxysporum* e outro de *Fusarium solani*. As espécies são da Coleção de Fungos da Universidade Federal do Maranhão no NIBA/DEPAT/CCBS. De cada metabólito foram realizados a triagem química, a atividade antioxidante, a antitumoral em célula MCF-7 e citotóxica em célula normal de próstata, a atividade antibacteriana em cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e antifúngica em cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei*. A espectrometria de massa para determinação da composição química foi realizada somente no metabólito de *Fusarium solani*. **Resultados:** Foram identificadas as classes químicas fenóis, alcaloides, taninos, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonoides, xantonas. A espectrometria do metabólito de *F. solani* revelou a presença dos compostos majoritários 4-(2-Hydroxyethyl) phenol, L-Proline, N-valeryl, heptadecyl, Hexadecanoic acid methyl éster, 9-Octadecenoic acid (Z)-methyl éster na fração acetato de etila e Benzeneacetic acid, Acetic acid, phenyl-, -(2-Hydroxyethyl) phenol e 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (Oleato de Metila) na fração diclorometano. Os dois metabólitos secundários têm atividade antioxidante. Os metabólitos secundários de *Fusarium oxysporum* na concentração de 1000 µg/mL apresentou efeito proliferativo em célula MCF-7 e citotóxico em célula normal de próstata ambos em 48hs. Os metabólitos secundários de *Fusarium solani* na concentração de 1000 µg/mL reduziu a viabilidade da célula MCF-7 em 48hs, e em célula normal não apresentou efeito citotóxico nos tempos analisados comparados ao controle negativo. Os metabólitos de ambos os fungos testados apresentam atividade antibacteriana significativa ($p < 0,0010$) em cepas de *E. coli* em todas as concentrações em 24 e 48hs. Os metabólitos secundários de *F. oxysporum* inibiu significativamente ($p < 0,0001$) *S. aureus* em todas as concentrações em 24hs, e em 48hs houve redução da viabilidade celular apenas nas concentrações 0,0625 até 8 µg/mL. Os metabólitos secundários de *Fusarium solani* inibiu significativamente ($p < 0,0001$) *S. aureus* em 24hs em todas as concentrações. Em 48hs apenas as menores concentrações 0,0625 a 4 µg/mL reduziram significativamente ($p < 0,0001$) a viabilidade celular e nas concentrações 16 e 32 não houve inibição. A atividade antifúngica dos metabólitos *F. oxysporum* reduziu significativamente *C. albicans* em todas as concentrações em 24hs. Em 48hs houve redução significativa nas menores concentrações (0,0625 a 4 µg/m). Para *C. krusei* houve redução significativa ($p < 0,0001$) nas concentrações de 0,0625 a 8 µg/mL em 24hs. Os metabólitos secundários de *Fusarium solani* reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a viabilidade de *C. albicans* em todas as concentrações analisadas em 24 e 48hs. Em *C. krusei* houve redução significativa ($p < 0,0001$) de 0,0625 até 16 µg/ml em 24hs e em 48hs todas as concentrações reduziram significativamente a viabilidade celular. **Conclusão:** A cepa isolada do ar foi identificada por PCR como *Fusarium solani*. Os dois metabólitos são antioxidantes, possuem composto fenólicos, flavonoides. No metabólito secundário de *Fusarium solani* existem compostos, citados pela literatura, com propriedades antitumoral e antimicrobiana. No presente estudo, o *Fusarium solani* apresentou relativa atividade antitumoral em linhagens MCF-7.

Palavras-chave. *Fusarium*; Metabólito secundário; Atividade biológica.

Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Introduction: Secondary metabolites of the *Fusarium* genus have been considered as a source of bioactive molecules against cancer, bacteria and fungi. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the antioxidant, antitumor, antifungal and antibacterial activities of secondary metabolites obtained from two species of the genus *Fusarium*. **Methodology:** Two secondary metabolites were obtained, one of *Fusarium oxysporum* and the other of *Fusarium solani*. The species are from the Fungi Collection of the Federal University of Maranhão in NIBA/DEPAT/CCBS. From each metabolite were performed the chemical screening, the antioxidant activity, the antitumor in MCF-7 cell and cytotoxic in normal prostate cell, the antibacterial activity in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains and antifungal in strains of *Candida albicans*, *Candida krusei*. Mass spectrometry to determine the chemical composition was performed only on the *Fusarium solani* metabolite. **Results:** The chemical classes phenols, alkaloids, tannins, anthocyanins and anthocyanidins, flavones, flavonoids, xanthenes were identified. Spectrometry of the *F. solani* metabolite revealed the presence of 4-(2-hydroxyethyl) phenol, L-Proline, N-valeryl, heptadecyl, hexadecanoic acid methyl ester, 9-octadecenoic acid (Z)-methyl ester in the ethyl fraction of acetate and benzeneacetic acid, acetic acid, phenyl-, - (2-hydroxyethyl) phenol E9-octadecenoic acid (Z) -, methyl ester (methyl oleate) in the dichloromethane fraction. The two secondary metabolites have antioxidant activity. The secondary metabolites of *Fusarium oxysporum* at the concentration of 1000 µg/mL showed a proliferative effect on MCF-7 cells and cytotoxic effect on normal prostate cells, both within 48 hours. The secondary metabolites of *Fusarium solani* at a concentration of 1000 µg/mL reduced the viability of the MCF-7 cell in 48 hours, and in normal cells it did not show cytotoxic effect in the analyzed times compared to the negative control. The metabolites of both fungi tested showed significant antibacterial activity ($p < 0.0010$) in *E. coli* strains at all concentrations in 24 and 48 hours. The secondary metabolites of *F. oxysporum* significantly inhibited ($p < 0.0001$) *S. aureus* at all concentrations within 24h, and within 48h there was a reduction in cell viability only at concentrations from 0.0625 to 8 µg/mL. The secondary metabolites of *Fusarium solani* significantly inhibited ($p < 0.0001$) *S. aureus* in 24h at all concentrations. In 48 hours only the lowest concentrations 0.0625 to 4 µg/mL significantly reduced ($p < 0.0001$) cell viability and at concentrations 16 and 32 there was no inhibition. The antifungal activity of *F. oxysporum* metabolites significantly reduced *C. albicans* at all concentrations within 24h. In 48 hours there was a significant reduction in the lowest concentrations (0.0625 to 4 µg/m). For *C. krusei* there was a significant reduction ($p < 0.0001$) in concentrations from 0.0625 to 8 µg/mL in 24 hours. The secondary metabolites of *Fusarium solani* significantly ($p < 0.0001$) reduced the viability of *C. albicans* at all concentrations analyzed in 24 and 48 hours. In *C. krusei* there was a significant reduction ($p < 0.0001$) from 0.0625 to 16 µg/ml in 24h and in 48h all concentrations significantly reduced cell viability. **Conclusion:** The strain isolated from the air was identified by PCR as *Fusarium solani*. The two metabolites are antioxidants, have phenolic compounds, flavonoids. In the secondary metabolite of *Fusarium solani* there are compounds, cited in the literature, with antitumor and antimicrobial properties. In the present study, *Fusarium solani* showed relative antitumor activity in MCF-7 strains.

Keywords. *Fusarium*; Secondary metabolite; Biological activity. Antioxidant activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
BHI	Brain Heart Infusion
MALDIT-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Marcador Filogenético Ribossômico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
rDNA	DNA ribossômico
ANDRA	Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado
RFLP	Análise do Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição
T-RFLP	Polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição
RAPD	Polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado, polimorfismo amplificado ao acaso
REP, ERIC e BOX.	Variações da PCR com primers complementares de sequências repetidas
LAMP	amplificação isotérmica mediada por loop
NASBA	amplificação baseada em ácido nucleico
ARCA	Rolling Circle Amplification
ITS	região Internal Transcribed Spacer
TEF1α	Gene β -tubulina, sequenciadores do fator de alongação parcial 1- α
TUB2	Tubulin Beta Chain
LSU	Subunidade grande do complexo do gene rRNA
GenBank	Banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos publicamente disponíveis e suas traduções de proteínas
COI	β -tubulina, citocromo oxidase I
mtSSU	subunidade pequena
cmd	Calmodulina
BRCA1	Gene mutação marmária
BRCA2	Gene mutação mamária
APCS	Células Apresentadoras de Antígenos
SOD	Superóxido-dismutases
CAT	Catalase
GPX	Glutathiona
arp-2	Proteína ribossômica 60S P2

asp	Protease Aspártica
Hog1	Histidina Quinase
NIR	regiões redutase de nitrato
UTP	Redutase putativa
MRSA	<i>Staphylococcus aureus resistentes à meticilina</i>
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus resistentes à meticilina associados aos cuidados de saúde</i>
VRSA	<i>Staphylococcus aureus resistentes à vancomina</i>
PBP	Proteína ligadora de Penicilina
BDA	Ágar Batata Dextrose
AcOEt	Acetato de etila
EPEC	<i>E. coli enteropatogênica</i>
ETEC	<i>E. coli enterotoxigenica</i>
EIEC	<i>E. coli enteroivasiva</i>
ECST	<i>E. coli shigatoxigênica</i>
EAEC	<i>E. coli enteroagregativa</i>
ECAD	<i>E. coli aderente difusa</i>
DAEC	<i>E. coli aderente invasora</i>
EHEC	<i>E. coli enterohemorrágica</i>
SDA	Ágar Sabouraud-Dextrose

LISTA DE FIGURAS

		P
Figura 1.	Ciclo de vida dos fungos filamentosos	20
Figura 2.	Estrutura e composição da parede celular dos fungos.	21
Figura 3.	Características morfológicas evidenciando a macroscopia da colônia em meio Ágar Sabouraud e, a microscopia do microcultivo de <i>Fusarium solani</i> . A- Anverso da colônia – colônia branca e algodonosa. B- Reverso da colônia evidenciando o pigmento da colônia. C e D – As setas indicam as hifas septadas, conídios e blastoconídios.	22
Figura 4.	Características macroscópicas e microscópicas da cepa de <i>Fusarium solani</i> . Acervo coleção de fungos NIBA/UFMA. A- Verso apresentando colônia algodonosa branca. B-reverso coloração bege. C.- microcultivo evidenciando hifas hialinas, microconídios contendo 2 a 3 septos e macroconídios em forma de foice. Crescimento em ágar Sabouraud, colônia de 7 dias.	26
Figura 5.	Classificação Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades <70 anos em 2019. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda.	31
Figura 6.	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Adaptado de Inca 2019.	32
Figura 7.	A mama: estrutura, fatores de risco e estágios do desenvolvimento do câncer.	33
Figura 8	Diferenças entre as paredes das células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas.	36
Figura 9	Mecanismo de ação dos antibióticos em <i>S. aureus</i> os antibióticos. Verde- antibióticos existentes; Azul: os novos antibióticos aprovados e disponíveis; Laranja os antibióticos em desenvolvimento.	37
Figura 10	Esquema geral dos mecanismos descritos como envolvidos na resistência do biofilme de espécies de <i>Candida</i> .	39
Figura 11	Alvos antibióticos e mecanismos de resistência	40

Figura 12.	Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência do gênero <i>Candida</i> aos antifúngicos.	41
Figura 13.	Fluxograma do experimento: produção dos extratos metabólicos de <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i> .	43
Figura 14.	Cepas fúngicas e bacterianas utilizadas nesse estudo. A – <i>Fusarium oxysporum</i> ; B- Cepa de <i>Fusarium solani</i> ; C- <i>Candida krusei</i> ATCC 6258; D- <i>Candida albicans</i> ATCC 14053; E- <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; F- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	44
Figura 15.	Procedimento para extração do metabólito secundário de duas espécies do gênero <i>Fusarium</i>	48
Figura 16.	Ensaio de atividade antioxidante dos metabólitos secundário de <i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i> pelo método DPPH	50
Figura 17.	Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços. A- Atividade antifúngica; B- atividade antibacteriana.	53
Figura 18.	Macroscopia e microscopia de <i>Fusarium solani</i> isolado do ar. Cultura em tubo em meio Ágar Sabouraud; C e D – Cultura em placa em meio Ágar Sabouraud; E, F e G- Microcultivo 40X microscópio Biotika B20.	55
Figura 19.	Gel de eletroforese visualizado em transluminador demonstrando a amplificação das amostras selecionadas.	56
Figura 20.	Curva da porcentagem de atividade antioxidante dos metabólitos secundários de <i>Fusarium solani</i> isolado do ar e <i>Fusarium oxysporum</i> .	57
Figura 21.	Perfil cromatográfico da fração acetato de etila do metabólito secundário de <i>Fusarium solani</i> . Fração acetato de etila.	59
Figura 22.	Compostos químicos identificados na fração diclorometano do metabólito secundário de <i>Fusarium solani</i> .	60
Figura 23	Perfil cromatográfico da fração diclorometano do metabólito de <i>Fusarium solani</i> .	61
Figura 24	Compostos químicos identificados na fração diclorometano do metabólito secundário de <i>Fusarium solani</i> . Estrutura química identificada no site https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound (2021).	62
Figura 25.	Avaliação da citotoxicidade dos metabolitos secundários de <i>F. oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i> em linhagens de células de	64

adenocarcinoma mamário MCF-7 e linhagens célula normal de próstata PNT.

- Figura 26. Atividade antibacteriana dos metabólitos secundários *F. oxysporum* e *Fusarium solani* em cepas de *E. coli* e *S. aureus*. 66
- Figura 27. Atividade Antifúngica dos metabólitos secundários de *F. oxysporum* e *Fusarium solani* em cepas de *C. albicans* e *C. krusei*. 67

LISTA DE TABELAS

		P
Tabela 1	Lista de Banco de dados mais comuns para busca de sequencias de DNA e outras características dos fungos.	25
Tabela 2.	Compostos químicos e atividades biológicas do metabólito secundário de espécies do gênero <i>Fusarium</i> .	29
Tabela 3	Sequência de primers espécie-específico e pares de base.	45
Tabela 4	Descrição dos ciclos de PCR realizados para espécies de <i>Fusarium</i> .	46
Tabela 5	Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH, expressa como CE ₅₀ .	57
Tabela 6	Classes de químicas presentes nos metabólitos secundários de <i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i> .	58
Tabela 7	Teor de Fenólicos nos metabólitos secundários de <i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i>	58
Tabela 8	Teor de Flavonoides totais nos metabólitos secundários de <i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i> .	59
Tabela 9	Compostos identificação no metabólito secundário <i>Fusarium solani</i> -Biblioteca NIST08. Fração acetato de etila	60
Tabela 10	Compostos identificados no metabólito fúngico de <i>Fusarium solani</i> . Biblioteca NIST08. Fração Diclorometano.	61

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1. Características gerais dos fungos.....	19
2.2. Taxonomia e identificação de fungos	21
2.2.1 Identificação dos fungos pelo MALDI-TOF MS.....	22
2.2.2 Identificação por biologia molecular	23
2.3 O gênero <i>Fusarium</i>	26
2.3.1 Características taxonômicas do gênero <i>Fusarium</i>	26
2.3.3. Metabólitos produzidos por fungos.....	27
2.4.O Câncer	31
2.4.3 Tratamento do câncer	34
2.5 Substâncias antioxidantes	34
2.6 Microrganismos.....	35
2.6.1 Bactérias	35
2.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.6.2 <i>Escherichia coli</i>	37
2.6.3. Gênero <i>Candida</i>	38
2.6.4 Resistências ao antimicrobianos.....	39
3.OBJETIVOS.....	42
3.1 Geral.....	42
3.2 Específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. <i>Screening</i> do estudo	43
4.2. Cepas fúngicas e bacterianas utilizadas no estudo.....	44
4.2.1 Preparo das amostras.....	44
4.2.2 Identificação por biologia molecular	45
4.2.2.1 Desenho de <i>Primers</i>	45
4.2.2.3 Extração de DNA.....	45
4.2.2.4 Reação da cadeia em polimerase (PCR)	46
4.2.2.4 Eletroforese	47
4.3 Obtenção dos metabólitos das espécies de <i>Fusarium</i>	47
4.4.1. Determinação das classes químicas dos metabólicos.....	48
4.4.2 Perfil cromatográfico dos metabólitos secundários	49

4.5. Atividade antioxidante	50
4.6.1 Linhagens tumorais	51
4.7 Atividades Biológicas dos metabólitos secundários.....	52
4.8. Análise estatística	54
5. RESULTADOS.....	55
5.2 Análise das atividades antioxidante, antitumoral e antimicrobiana dos do metabólito das espécies de <i>Fusarium</i>	56
5.2.1 Atividade antioxidante.....	57
5.2.2 Determinação das classes químicas nos metabólitos secundário... 58	
5.2.1 Teor Fenólico totais	58
5.2.2 Teor de Flavonoides totais	59
5.3 Perfil cromatográfico do metabólito secundário de <i>F. solani</i>.....	59
5.3 Atividade antitumoral	63
5.4. Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários	65
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* é comumente conhecido como fungo endófito, que coloniza e interage com as plantas sem causar dano à planta hospedeira. Desta interação sintetizam metabólitos secundários constituídos por uma diversidade de moléculas bioativas com potencial para formulações farmacêuticas (STROBEL, 2018; TOGHUEO, 2020).

Os metabólitos secundários são considerados produtos naturais menos tóxicos e com estrutura química complexa e de alto valor farmacológico (GONÇALVES; BASTOS; HANNA, 2017; TAKAHASHI et al., 2017). O metabólito secundário de várias espécies do gênero *Fusarium* tem sido destaque, na literatura, apresentando atividade antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (MOSUNOVA; NAVARRO-MUÑOZ; COLLEMARE, 2020).

Dentre os compostos presentes encontram-se os flavonoides, alcaloides, terpenos, tetralonas, xantonas isocumarinas, polissacarídeos, ácidos fenólicos e benzopiranonas, todos considerados com potencial farmacológico (GRECO; KELLER; ROKAS, 2019).

O uso dos fungos e seus metabólitos como fonte de compostos bioativos para a saúde é comprovado por vários medicamentos disponíveis no mercado e que são oriundos de metabólitos fúngicos, tais como a penicilina, ciclosporina, taxol, lovastatina e (KASAEI et al., 2017; PATHAK et al., 2020; SALEHI et al., 2018).

O câncer é um importante problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2018, ocorreram cerca de 18,1 milhões de casos, e destes 9,6 milhões evoluíram a óbito. Além disso, entre 2018-2029, estima-se que um em entre cinco homens e uma em entre seis mulheres desenvolverão algum tipo de câncer e que, um entre oito homens e uma entre onze mulheres irão evoluir para óbito após cinco anos de diagnóstico (WHO, 2018). Os tipos mais frequentes são câncer de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%) nos homens e nas mulheres, mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%). Para o estado do Maranhão, estima-se que 8.800 novos

casos irão surgir nos próximos anos, com aumento para o número de câncer de mama feminina, útero, pênis e próstata (INCA 2019).

Outro problema a ser destacado é a resistência aos antimicrobianos. Cada vez mais bactérias e fungos surgem mais resistentes às substâncias antimicrobianas disponíveis, as quais sua ação devido aos mecanismos de resistências inerentes aos microrganismos. Dessa forma, a obtenção de moléculas antimicrobianas a partir dos metabólitos secundários fúngicos são extremamente importantes (TOGHUEO, 2020).

Nesta pesquisa, avaliamos as possíveis atividades biológicas dos extratos metabólicos de duas cepas do gênero *Fusarium*, uma vez que este fungo se destaca entre os cinco gêneros mais isolados dentre a microflora anemófila presente na cidade de São Luís- MA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Características gerais dos fungos

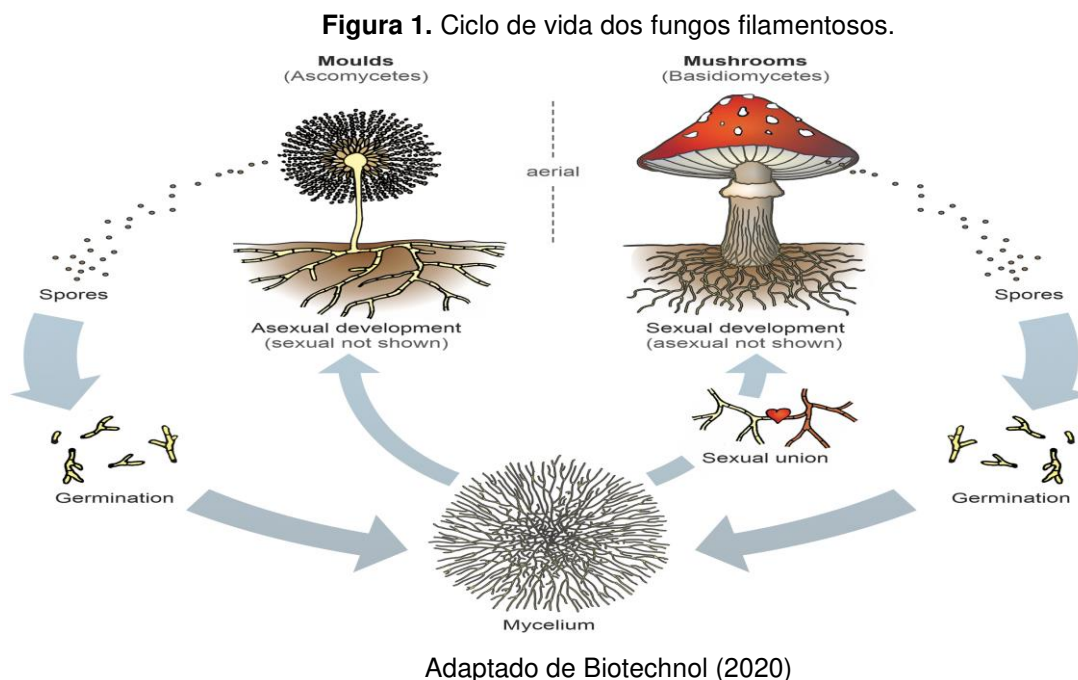
Estima-se que o reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies, com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no mundo. Até o momento cerca de 70.000 espécies foram descritas representando apenas cerca de 6% da diversidade total dos fungos (SILVA; MALTA, 2016).

O Reino Fungi possui três grupos distintos de fungos, sendo os fungos filamentosos e leveduriformes considerados fungos microscópicos e os cogumelos considerados fungos macroscópicos. A forma filamentosa constitui-se por filamentos longos e ramificados chamados de hifas e a forma leveduriforme constitui-se por células individuais que podem se reproduzir por fissão binária ou brotamentos. Existe a forma dimórfica, onde os fungos sofrem interferência das condições ambientais, como a temperatura podendo desenvolver a forma de filamentosa (25°C) ou a de levedura (37°C).(AZEVEDO; BARATA, 2018)

Todos os fungos são microrganismos eucarióticos, uni ou multicelulares, possuem parede celular e estruturas reprodutivas variadas, são heterotróficos, sua nutrição é feita por absorção através da síntese de enzimas extracelulares como amilase, carboxilase, proteinase, lacases, dentre outras, que são liberadas para a degradar seus substratos e absorver os nutrientes (KÜES, 2015; SILVA; MALTA, 2016). São encontrados em diversos ambientes como água, ar, solo, animais e vegetais vivos, parasitando-os ou fazendo simbiose, em material orgânico em decomposição e nos alimentos (PEREIRA et al., 2013).

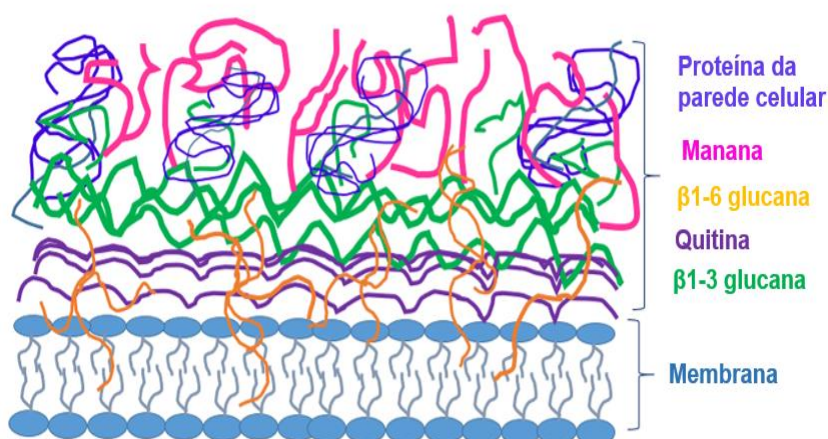
Além disso, os fungos multicelulares ou filamentosos (Figura 1) se desenvolvem a partir de um esporo, que na presença de umidade e nutrientes em determinado ambiente, cresce e germina. Durante seu crescimento, forma-se um tubo germinativo que se alonga formando a hifa. Após alguns dias a hifa forma um emaranhado de hifas denominado de micélio. Alguns fatores ambientais estimulam os fungos a formar estrutura reprodutivas, por exemplo, os ascomicetos formam conidióforo com esporos assexuados e/ou corpos frutíferos com esporos sexuais; os basidiomicetos (cogumelos) formam corpos frutíferos e formam esporos sexuais e se

dispersam no ar (BIOTECHNOL et al., 2020) O micélio é dividido em micélio de sustentação responsável pela degradação e absorção de nutrientes e micélio aéreo que sustenta as estruturas como os esporos e conídios (GOW; LATGE; MUNRO, 2017).



A célula fúngica possui uma parede rígida (Figura 2) formada por polissacarídeos conhecidos como glucanas e quitina, e glicoproteínas representando aproximadamente 40% do volume total da célula e espessura variando entre 0,1 a 1,0 μm e sua função é proteger o fungo contra as condições adversas como estresses ambientais e osmóticos controlando a entrada de moléculas prejudiciais à célula fúngica (HASIM; COLEMAN, 2019; (DERBYSHIRE; DELANGE, 2021).

Figura 2. Estrutura e composição da parede celular dos fungos.



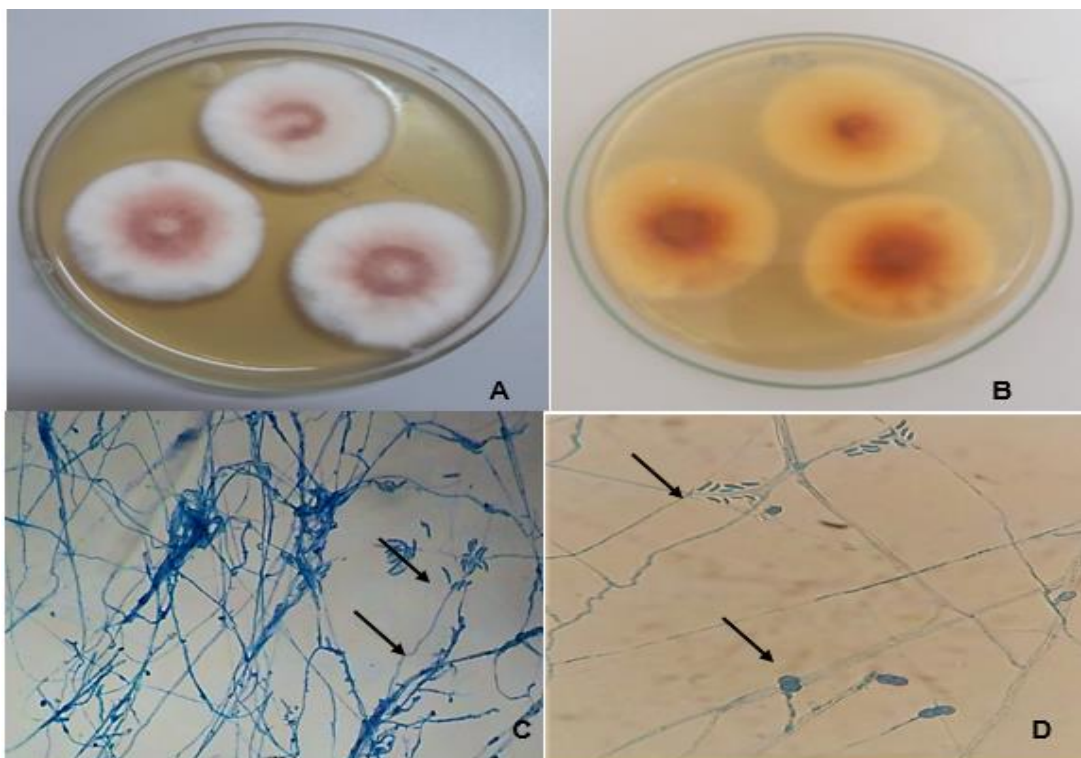
Autora adaptado de Derbyshire; Delange (2021).

A quitina, polissacarídeo presente na parede dos fungos, é constituída por um polímero de cadeia longa de N-acetilglicosamina, ligado a β -glucano, glicoproteínas e oligossacarídeos formando cadeias laterais com mananas α - (1-2), α - (1-3), β - (1-2), β - (1-6). Nos fungos leveduriformes representa de 1 a 2% do seu peso seco e nos fungos filamentosos representa de 10-20%. Sua função é manter a resistência mecânica e a integridade estrutural da célula fúngica (HASIM; COLEMAN, 2019).

2.2. Taxonomia e identificação de fungos

A taxonomia polifásica é realizada com base nas características macroscópicas e microscópicas, comparando com uma chave dicotômica onde avalia-se as características das hifas, conídios, blastoconídios e esporoconídios (figura 3). No entanto, o conhecimento do taxonomista acerca desses detalhes é extremamente importante, uma vez que tais características são analisadas utilizando diferentes meios de culturas, microcultivo, chave de identificação, meios cromogênicos, métodos bioquímicos e fisiológicos. Métodos mais avançados como MALDI-TOF MS e biologia molecular, complementam a identificação dos fungos e novas redefinições filogenéticas surgiram com novos conceitos e agrupamentos dos fungos em grandes complexos fúngicos (DI COLOGNA, 2017).

Figura 3. Características morfológicas evidenciando a macroscopia da colônia em meio Ágar Sabouraud e, a microscopia do microcultivo de *Fusarium solani*.



A- Anverso da colônia – colônia branca e algodoadosa. B- Reverso da colônia evidenciando o pigmento da colônia. C e D – As setas indicam as hifas septadas, conídios e blastoconídios.
Fonte: Autora.

2.2.1 Identificação dos fungos pelo MALDI-TOF MS

A técnica *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) surgiu a partir dos conhecimentos obtidos pelo método proteômica, o qual compreende um conjunto de proteínas específica ou expressa por uma célula, órgão, tecidos ou secreções. Essas proteínas expressam os metabólitos e produtos gênicos das espécies analisadas o que contribuiu para o desenvolvimento da técnica MALDI-TOF-MS no diagnóstico de cepas em determinada amostra (SINGHAL et al., 2015).

O MALDI-TOF MS tem como base a espectrometria de massas de alta resolução para determinar, através das massas moleculares dos compostos orgânicos, a identificação e caracterização de vários microrganismos como bactérias, vírus e fungos, a partir das proteínas ribossomais que são biomarcadores celulares

específicos de microrganismos, dando uma vantagem na identificação rápida e segura dos patógenos fúngicos (FRASER et al., 2016; PATEL, 2019).

Gómez-Velásquez et al., (2020) ressaltam que a identificação fenotípica na qual se analisa as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos, necessitam de mais ajustes para um diagnóstico seguro. Entretanto, a técnica MALDI-TOF MS possui algumas limitações como 1) qualidade do extrato proteico do micélio com as características estruturais diferentes; 2) a falta de referência dos espectros de algumas espécies de fungos filamentosos nas bibliotecas comerciais, principalmente de isolados de fungos endêmicos ou frequentes em regiões tropicais; 3) a dificuldade em atender o que foi determinado pelos fabricantes em algumas espécies.

A identificação dos fungos pelo MALDI-TOF MS é feita por transferência direta, onde o fungo é colocado diretamente na placa sem tratamento ou extração de proteína. E também por transferência direta estendida na qual ocorre o tratamento prévio do fungo com ácido fórmico, seguindo uma etapa de extração de proteína fora da placa (PATEL, 2019). Existem algumas vantagens do MALDI-TOF MS sobre a taxonomia convencional, dentre as quais podemos destacar: a alta sensibilidade e especificidade, o rápido diagnóstico e geração de pouco resíduo (SANTOS et al., 2016).

2.2.2 Identificação por biologia molecular

A Biologia Molecular permitiu um grande avanço na taxonomia dos fungos por ser um método seguro e específico e tem como base a interação de todos os sistemas celulares e suas estruturas como o DNA, o RNA e síntese de proteína (MOHAMED, 2012; WALKER et al., 2016). Este método permite identificar e sequenciar microrganismos utilizando várias ferramentas como: Marcador Filogenético Ribossômico (rRNA), PCR-clonagem-sequenciamento, análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ANDRA), análise do polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP), polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado, polimorfismo amplificado ao acaso (RAPD), variações da PCR com primers

complementares de sequências repetidas REP, ERIC e BOX (boxA, boxB e box) (WICKES; WIEDERHOLD, 2018).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a segunda etapa da biologia molecular. Essa tem como função amplificar uma única ou poucas cópias de um pedaço de DNA e baseia-se no processo de replicação do DNA que ocorre in vivo. Pode ser realizada pelos métodos: PCR em tempo Real (PCR em tempo real ou PCR quantitativo em tempo real), PCR isotérmica (amplificação isotérmica mediada por loop – LAMP; amplificação baseada em ácido nucleico-NASBA; Rolling Circle Amplification – ARCA), ambos os métodos, necessitam de quantidades expressivas de ácidos nucleicos do fungo (SCHOCH et al., 2014; WICKES; WIEDERHOLD, 2018).

Para a análise da PCR em fungos utiliza-se o primer universal ou específico de cada gênero. O primer mais utilizado é o da região Internal Transcribed Spacer (ITS) do DNA ribossômico em fungos que contém entre 400-800 pares de bases. É um marcador universal de código de barras de DNA para fungos, entretanto, por ser variável é necessário adicionar marcadores secundários como gene β -tubulina, sequenciadores do fator de alongamento parcial 1- α (TEF1 α), genes codificadores de proteínas (PORRAS-ALFARO et al., 2014).

No entanto, Valenzuela-Lopez et al., (2018) sugerem que, dependendo da espécie fúngica, pode-se utilizar os genes ITS, LSU por estarem sequenciados e depositados nos bancos de dados e, tub2 e TF1 α . De acordo com os autores, esses genes são fáceis de amplificar. Além desses, indicam também o gene rpb2, que é um dos marcadores mais completos a nível de informação, possibilitando uma melhor classificação taxonômica.

A identificação de fungos baseada na biologia molecular requer banco de dados de DNA amplamente atualizado, contendo sequências de DNA públicas, associadas a dados de espécies registradas e suas respectivas nomenclaturas e padrões. O GenBank possui vários colaboradores (Tabela 1) que arquivam dados genéticos com abrangência mundial (SCHOCH et al., 2014).

Tabela 1. Lista de Banco de dados mais comuns para busca de sequências de DNA e outras características dos fungos.

	BANCO DE DADOS	CARACTERÍSTICA
GenBank	Banco de dados genéticos - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/	Arquivar os dados genéticos mundiais como um recurso aberto a todos os pesquisadores.
ENA	Arquivo Europeu de Nucleotídeos - https://pt.qaz.wiki/wiki/European Nucleotide Archive	
INSDC	Colaboração Internacional de Bancos de Dados de Sequência de Nucleotídeos - http://www.insdc.org/	
ISHAM	Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal - www.mycologylab.org	Arquiva dados da região ITS com curadoria focado em fungos patogênicos humanos e animais
UNITE	Identificação baseada em rDNA ITS de eucariotos e sua comunicação pe DOIs - http://unite.ut.ee/	Fornecer ferramentas para avaliar a qualidade da sequência e anotação de sequência de terceiros baseada na Web (PlutoF) para sequências publicadas para todos os Fungos. É o espelho do GenBank para todas as sequências ITS de fungos e tem um foco particular na integração de sequências de amostras ambientais em estruturas taxonômicas.
ITSoneDB	Eukaryal Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 Database - http://itsonedb.cloud.ba.infn.it/	Contém uma coleção abrangente de sequências do espaçador transcrito interno 1 (ITS1) do RNA ribossômico eucariótico.
BDITS2	Database Banco de Dados ITS2. http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de	Contém sequência de bancada para inferência filogenética e, simultaneamente, considerando a estrutura secundária do espaçador interno transcrito 2.
BOLD/ EUBOLD	Barcode of Life Data System - https://www.boldsystems.org/	Está configurado para código de barras de DNA e identificação online que podem comparar sequências desconhecidas simultaneamente com vários bancos de dados de referência.
CBS- KNAW	Fungal Biodiversity Center, MycoBank - https://www.mycobank.org/	

Fonte: Autora.

2.3 O gênero *Fusarium*

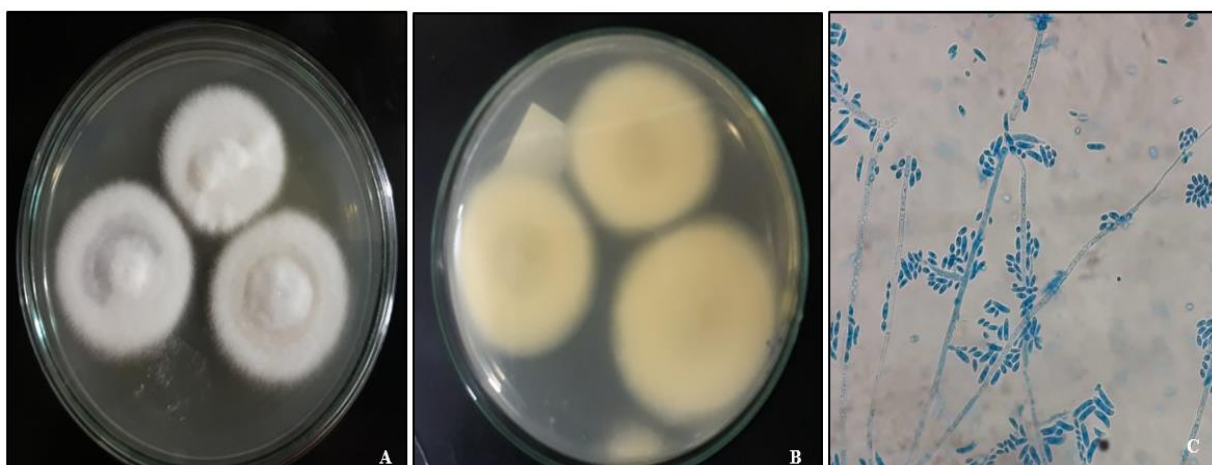
2.3.1 Características taxonômicas do gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é constituído por vários complexos filogenéticos. Está organizado no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae. O termo *Fusarium* representa um estado anamorfo da ordem Hypocreales (WALKER et al., 2016).

São fungos filamentosos cosmopolitas e podem ser isolados do ar, da água, de infecções humanas e animais e, principalmente das plantas (VILLANI et al., 2019). Atualmente cerca de 1000 espécies estão identificadas, dentre as quais destacam-se as espécies *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. nygamai*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. clamidosporum*, *F. proliferatum*, *F. fujikuroi* como as mais frequentes (LI et al., 2019)

Em geral as colônias de *Fusarium spp.* apresentam crescimento rápido de até 7 dias a 25°C em diferentes meios de cultura. As colônias são brancas aveludadas a lanosa ou algodonosa, grandes com uma variedade de cores variando entre rosa e violeta, cinza e branco, amarelo e marrom, sendo o reverso usualmente claro. As características microscópicas revelam hifas hialinas e septadas, conidióforos ausentes, e as fiálides nascem diretamente das hifas, formando microfialoconídios solitários ou em cachos e macroconídios grandes em formato foice ou canoa divididos por septos (Figura 4) (SUMMERELL, 2019).

Figura 4. Características macroscópicas e microscópicas da cepa de *Fusarium solani*. Acervo coleção de fungos NIBA/UFMA.



A- Verso apresentando colônia algodonosa branca. B-reverso coloração bege. C.- microcultivo evidenciando hifas hialinas, microconídios contendo 2 a 3 septos e macroconídios em forma de foice. Crescimento em ágar Sabouraud, colônia de 7 dias. Fonte: Autora

A identificação molecular de *Fusarium spp.* tem sido realizada com as sequências que distinguem as espécies do gênero *Fusarium*, evidenciando as relações filogenéticas entre as espécies. Dentre estas sequências destacam-se os principais primers: do cluster de rDNA espaçador transcrito interno (ITS), β -tubulina, citocromo oxidase I (COI), fator de alongamento 1- α , histonas, subunidade pequena mitocondrial (mtSSU), calmodulina (cmd), proteína ribossômica 60S P2 (arp-2), Protease Aspártica (asp) e Histidina Quinase (hog1) esses marcadores permitem distinguir as subespécies uma vez que a variabilidade genética neste gênero ocorre nas regiões intrônicas (SINGHA et al, 2016; BRANKOVICS et al., 2018).

2.3.3. Metabólitos produzidos por fungos

Os metabólitos são produtos naturais e podem ser primários e secundários. Os metabólitos primários são moléculas produzidas durante o crescimento, e são essenciais para o crescimento e manutenção das funções celulares, além de servir como fonte de blocos de construção monoméricos para a produção de metabólitos secundários e enzimas extracelulares (CHROUMPI; MÄKELÄ, VRIES, 2020). Enquanto que os metabólitos secundários são produzidas durante o processo de nutrição dos fungos, onde estes liberam diversas enzimas para o meio e absorvem os alimentos pré-digeridos para suas células sintetizando várias moléculas durante seu metabólito secundário (BILLS; GLOER, 2016; SALEHI et al., 2018)

Atualmente, com os avanços da biologia sintética, da genética, da bioinformática e da química de produtos naturais é possível extrair e selecionar, a partir dos metabólitos primários e secundários produzidos pelos fungos, compostos para a formulação de novas drogas, como por exemplo flavonoide, alcaloide, terpenos, tetralonas, xantonas isocumarinas, polissacarídeos, ácidos fenólicos, benzopirranonas, policetídeos, peptídeos não ribossomais. Todos com atividades biológicas como antibióticos, antifúngicos, antiparasitários, antitumorais e antioxidantes (GRECO; KELLER; ROKAS, 2019).

As formulações de medicamentos utilizando metabolitos de fungos têm impactos positivos na sociedade. Um dos mais importantes medicamentos oriundos de metabolito de fungo foi a penicilina, um antibiótico descoberto por Fleming em 1928 a partir do metabólito de *Penicillium chrysogenum* e até hoje é muito utilizado na

sociedade (PATHAK et al, 2020); a ciclosporina é imunossupressor isolado do fungo *Tolypocladium inflatum* (OLMOS-SÁNCHEZ; ILLANA-ESTEBAN, 2017); o Taxol é considerado um composto bioativo “ouro”, para o tratamento de câncer, sendo isolado pela primeira vez da casca de *Taxus brevifolia* em 1971. É também isolados do metabólito dos fungos endofíticos *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizophora sp.*, *Taxomyces sp.* (KASAEI et al, 2017); o Fingolimode derivado da miriocina é um metabólito do fungo *Isaria sinclairii* é indicado para o tratamento de Esclerose Múltipla (CHENG et al., 2017); a Lovastatina é um redutor de colesterol isolado de *Aspergillus terreus* (BORUTA; BIZUKOJC, 2017).

Espécies do gênero *Fusarium* interagem com uma variedade de plantas, sendo um dos gêneros mais estudados como fungo endofítico (KAN et al, 2018). E, nos últimos anos, estudos revelam que o metabólito secundário de várias espécies de *Fusarium* contém diversas moléculas com propriedades farmacológicas (RATNAWEERA et al., 2015; RAN et al., 2017) e o seu potencial como fonte de novas drogas farmacêuticas (PESSÔA et al., 2017; et al., 2019; GUO, 2017; SALEHI et al., 2018; HYDE et al., 2019; MOSUNOVA; NAVARRO-MUÑOZ; COLLEMARE, 2020).

Dentre as propriedades farmacológicas dos metabólitos secundários do gênero *Fusarium* destacam-se compostos com atividade antitumoral, e para doenças cardiovasculares, bem como atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, e parasitárias (NASCIMENTO et al 2012; DESHMUKH; MATHEW; PUROHIT, 2014; ROMANS-FUERTE et al., 2016; CHOWDHURY et al., 2017; MEGHAVARNAM et al., 2017; KYEKYEKU et al., 2017; RAN et al., 2017; IBRAHIM et al., 2018; KHAN et al., 2018; SALEHI et al., 2018; WU et al., 2018) (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos químicos e atividades biológicas do metabólito secundário de espécies do gênero *Fusarium*.

COMPOSTO QUÍMICOS	ESPÉCIE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Oxysporidinone derivado de 3-hydroxyl-2-piperidinone derivative	<i>Fusarium oxysporum</i>	Antitumoral Antibacteriana	WANG et al (2011)
Anhydrofusarubin Beauvericin	<i>Fusarium oxysporum</i>	Antiparasitária Anticâncer	NASCIMENTO et al (2012)
Bikaverin	<i>Fusarium spp.</i>	Antibacteriana Anticâncer	DESHMUKH; MATHEW; PUROHIT (2014)
β -resorcylic macrolide	<i>Fusarium spp.</i>	Antifúngico	SAETANG et al (2016)
Solaninaphthoquinone	<i>Fusarium solani</i>	Anticâncer	TADPETCH et al (2015)
L-asparaginase	<i>F.culmorum</i>	Anticâncer	MEGHAVARNAM et al (2016)
Fusaritoamida A, 1-O-acetylglycerol; 8-cetylneosolaniol, ergosta- 7,22-diene-3b,5a,6b-triol	<i>Fusarium chlamydosporium</i>	Antibacteriana, antifúngica Anticâncer	IBRAHIM et al (2016)
Sansalvamide	<i>Fusarium solani</i>	Anticâncer	ROMANS-FUERTE et al (2016)
Camptothecin	<i>Fusarium solani</i>	Antitumoral	RAN et al, (2017)
Naphthoquinone, 9- desmethylherbarine azaanthraquinone derivatives, 7- desmethylscorpinone 7-desmethyl-6- methylbostrycoidin	<i>F. solani</i>	Antitumoral	CHOWDHURY et al (2017)
Fusarielin J	<i>Fusarium tricinctum</i>	Anticâncer	HEMPHILL et al (2017)
Desmetil fusarina C	<i>Fusarium solani</i>	Antibacteriana	KYEKYEKU et al (2017)

Conti.

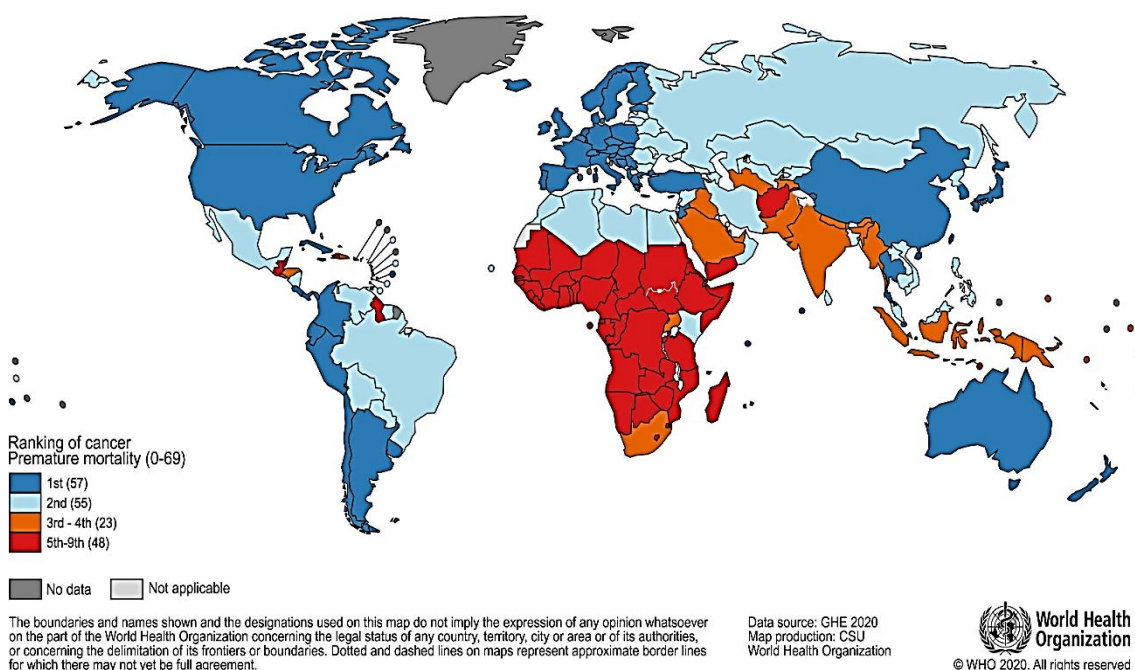
Fusarithioamide B	<i>Fusarium chlamydosporium</i>	Antibacteriana Antifúngica	IBRAHIM et al (2018)
Polysaccharides	<i>Fusarium spp.</i>	Anticâncer	SALEHI et al (2018)
3-epi-fusarielin H/3-O-methyl-fusarielin H/3-O-methyl-epi-fusarielin H	<i>Fusarium spp.</i>	Antimicrobiana	TCHOUKOUA et al (2018)
Naftaquinonas	<i>F. solani</i>	Anticâncer e antimicrobiano	KHAN et al (2018)
Aza-antraquinonas	<i>Fusarium spp.</i>	Antibacteriana, Pesticida Anticâncer	WU et al (2018)
Beauvericin (BEA)	<i>Fusarium spp.</i>	Anti-inflamatória	KHAYAT et al (2019)
Derivados de Fusaristerols ([(22E,24R)-3-palmitoyl-19(10→6)-abeo-ergosta-5,7,9,22-tetraen-3β-ol], [(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-3β,6β,9α-triol], [(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-3β,5α,6β,9α-tetraol 6-acetate], (22E,24R)-5β,8β-epidioxyergosta-22-en-3β-yl decanoate , (22E,24R)-ergosta-7,22-dien-3β-ol)	<i>Fusarium spp.</i>	Anti-inflamatória	KHAYAT et al (2019)
Karimunone B	<i>Fusarium spp.</i>	Antibacteriana	SIBERO et al (2019)

2.4.O Câncer

O câncer continua sendo um grande problema de saúde mundial e o aumento das taxas é sempre grande desafio para a população e os serviços de saúde. Fatores intrínsecos ao modo de vida da população como: sedentarismo, envelhecimento, alcoolismo, tabagismo e obesidade contribuem para as altas taxas de mortalidade (TORRE et al., 2015)(BRAY et al., 2018).

Dentre as doenças crônicas e não transmissíveis, as neoplasias malignas ocupam a primeira ou segunda principal causa de morte tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. As estimativas indicam que o câncer é a principal causa de morte antes dos 70 anos em 112 de 183 países e, ocupa o terceiro ou quarto lugar em 23 países (Figura 5). Novos casos poderão surgir no período de 2018 até 2040, atingindo cerca 29,5 milhões de indivíduos entre homens e mulheres e em todas as idades. Sendo esse aumento um reflexo dos fatores socioeconômicos, do número de idosos e da população, contribuindo para as novas estimativas (SUNG et al., 2021).

Figura 5. Classificação Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades <70 anos em 2019. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda.



Fonte: Organização Mundial da Saúde. Adaptado de Sung et al., (2021).

No Brasil, para o triênio 2020-2022, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (Figura 6). Sendo que o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

Figura 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Adaptado de Inca 2019.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.770	28,7%	Homens	Mulheres	Mama feminina	1.970	21,0%
Estômago	1.110	11,5%			Colo do útero	1.940	20,6%
Traqueia, brônquio e pulmão	870	9,0%			Cólon e reto	590	6,3%
Cólon e reto	490	5,1%			Traqueia, brônquio e pulmão	590	6,3%
Leucemias	410	4,2%			Estômago	550	5,9%
Cavidade oral	340	3,5%			Leucemias	320	3,4%
Sistema nervoso central	300	3,1%			Sistema nervoso central	280	3,0%
Esôfago	250	2,6%			Ovário	310	3,3%
Laringe	240	2,5%			Glândula tireoide	260	2,8%
Linfoma não Hodgkin	210	2,2%			Corpo do útero	230	2,4%

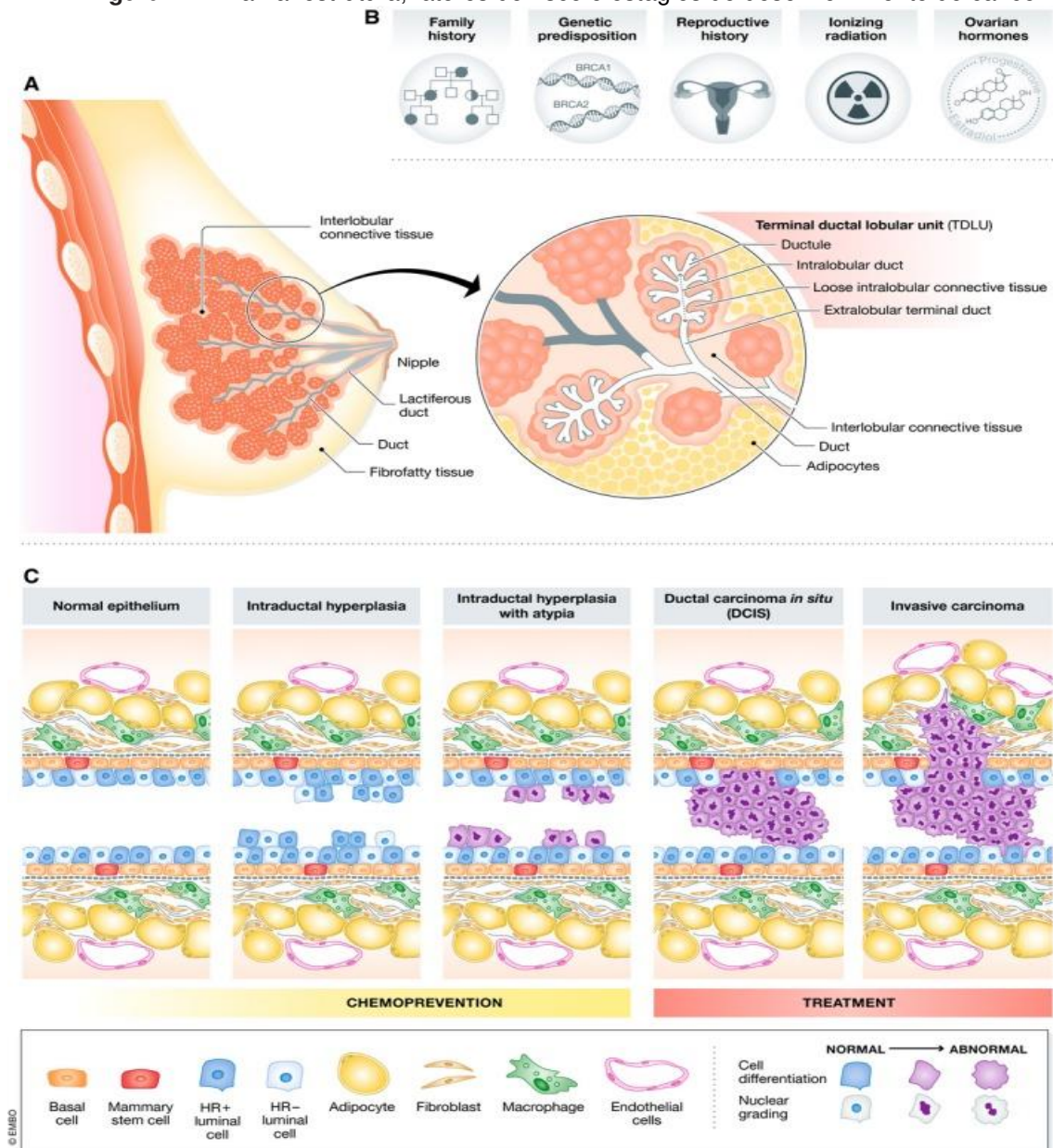
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte. INCA (2019).

De acordo com o INCA (2019), os cânceres de mama e de útero são tipos mais frequentes nas mulheres. O câncer de mama ocupa a primeira posição em todas as Regiões brasileiras, com um risco estimado de 81,06 por 100 mil na Região Sudeste; de 71,16 por 100 mil na Região Sul; de 45,24 por 100 mil na Região Centro-Oeste; de 44,29 por 100 mil na Região Nordeste; e de 21,34 por 100 mil na Região Norte. Já o câncer de útero ocupa a segunda posição como o mais incidente nas Regiões Norte (21,20/100 mil), Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil). Já na Região Sul (17,48/100 mil), ocupa a quarta posição e, na Região Sudeste (12,01/100 mil), a quinta posição (Tabelas 4, 12, 22, 27 e 32).

O câncer de mama (Figura 7) é um problema relevante para a saúde das mulheres no Brasil e no mundo, sendo a maior causa de mortalidade entre os tipos de cânceres atingindo cerca de 1 em 8 mulheres e estima-se que avance para 66.280 casos novos para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2019). Cerca de 1/3 das mulheres com câncer de mama desenvolvem a doença metastática, que é fator central da sobrevida global e qualidade de vida (ANASTASIADI et al.; 2017; AAMIR AHMAD, 2019).

Figura 7. A mama: estrutura, fatores de risco e estágios do desenvolvimento do câncer.



(A) Esquema da mama humana destacando unidades lobulares ductais terminais (TDLU s), o local de origem em vários cânceres de mama. (B) Alguns dos principais fatores de risco subjacentes ao status de alto risco para câncer de mama. (C) Esquema de um corte transversal ductal, representando a progressão do câncer de mama de epitélio bicamada normal para hiperplasia, para hiperplasia com atípia, para carcinoma ductal *in situ* e, finalmente, para doença invasiva. Adaptado de Tharmapalan et al., (2019).

2.4.3 Tratamento do câncer

As estratégias de tratamento mais utilizadas para o câncer envolvem cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, terapia-alvo, medicina personalizada, transplante de medula e imunoterapia (INCA, 2018). Além disso, existem vacinas contra o câncer como forma profilática ou terapêutica, que entrega os antígenos tumorais às células apresentadoras de antígenos (APCs) e assim, ativar o sistema imunológico do hospedeiro. Estas vacinas são constituídas de ácidos nucleicos(DNA e RNA), peptídeos, proteínas recombinantes, vetores microbianos, células apresentadoras de antígenos manipuladas (APCs), células tumorais autólogas e adjuvantes (INCA, 2018; DADAR et al., 2018; MAENG; BERZOFSKY, 2019; FISUSI; AKALA, 2019; PEIXOTO, 2021).

Todavia, a falta de seletividade para as células tumorais, o surgimento de células cancerígenas-fármaco resistente, e os fortes efeitos adversos, têm sido uma preocupação constante da terapia medicamentosa (SETON-ROGERS, 2013), além do fato que nem todos os tumores respondem aos tratamentos, limitando a eficácia terapêutica tanto para tumores primários quanto para metástases (PRENDERGAST et al., 2018). Outro desafio é o tratamento que geralmente inclui cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, imunoterapia (PALUMBO et al., 2013).

2.5 Substâncias antioxidantes

As substâncias antioxidantes têm sido alternativas como fontes naturais para o tratamento de várias doenças. Os antioxidantes são substância que reduzem a velocidade de oxidação através de mecanismos que incluem a inibição de radicais livres. Os radicais livres são resultados de processos fisiológicos realizados pelas organelas celulares como retículo endoplasmático, peroxissomos, lisossomos, membranas, núcleos e mitocôndrias. Esses processos são realizados pelas reações oxidação-redução gerando os radicais livres os quais participam de algumas funções como a fagocitose de patógenos. Entretanto, o excesso dos radicais livres induz o estresse oxidativo, bem como, o desencadeamento de várias doenças como o câncer, diabetes, aterosclerose, doença degenerativa como Alzheimer e Parkinson (ALVES et al., 2020).

Geralmente as células sofrem danos na presença de dos radicais livres. Para impedir esses danos, substâncias com atividade antioxidante podem agir diretamente sobre os danos neutralizando os radicais livres e, indiretamente através de sistemas enzimáticos. As substâncias antioxidantes são classificadas como enzimáticas constituídas por várias enzimas, como por exemplo, a (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) e, não enzimáticos como os compostos fenólicos, vitaminas (C, A e E), minerais, pigmentos naturais, carotenoides entre outros compostos (KUMAR et al., 2012; SUN et al., 2018).

Nos metabólitos secundários são identificadas várias classes de compostos com atividade antioxidante. As classes mais citadas são: flavonoides, flavonas, alcaloides, esteroides, terpenoides, quinonas, fenilpropanoide, isocumarinas, ligninas, fenóis (VERMA; LAL; DEBNATH DAS, 2017; TELES et al., 2020).

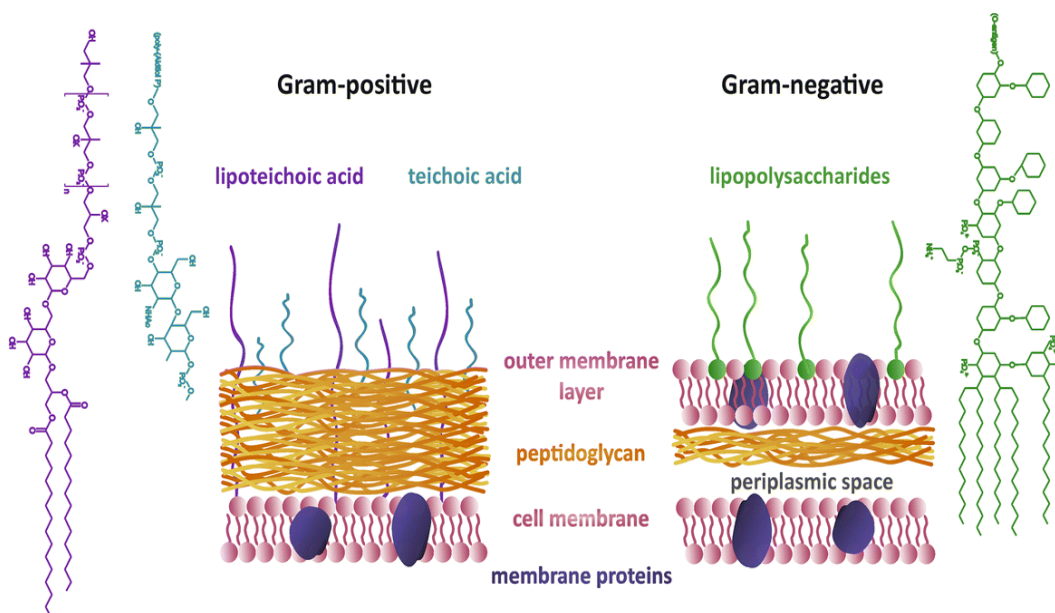
2.6 Microrganismos

2.6.1 Bactérias

As bactérias são organismos procariontes, unicelulares, composta por uma membrana externa, parede celular (Figura 8). Apresenta-se em três formas básicas cocos, bacilos e espirais. De acordo com a composição química da parede, as bactérias são dividida em gram-positivas e gram-negativas, (PAJERSKI et al., 2019).

A parede das bactérias gram-positivas é espessa (Figura 8), constituída por cerca 90% de peptidoglicano, parede de ácido teicóico e ácido lipoteicóico. Nas bactérias gram-negativas a parede é constituída por uma camada delgada de peptidoglicano, situada entre a célula e a membrana externa, existe o espaço periplasmático (MALANOVIC; LOHNER, 2016).

Figura 8. Diferenças entre as paredes das células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas.



Adaptado de Malavovic; Lohne (2010)

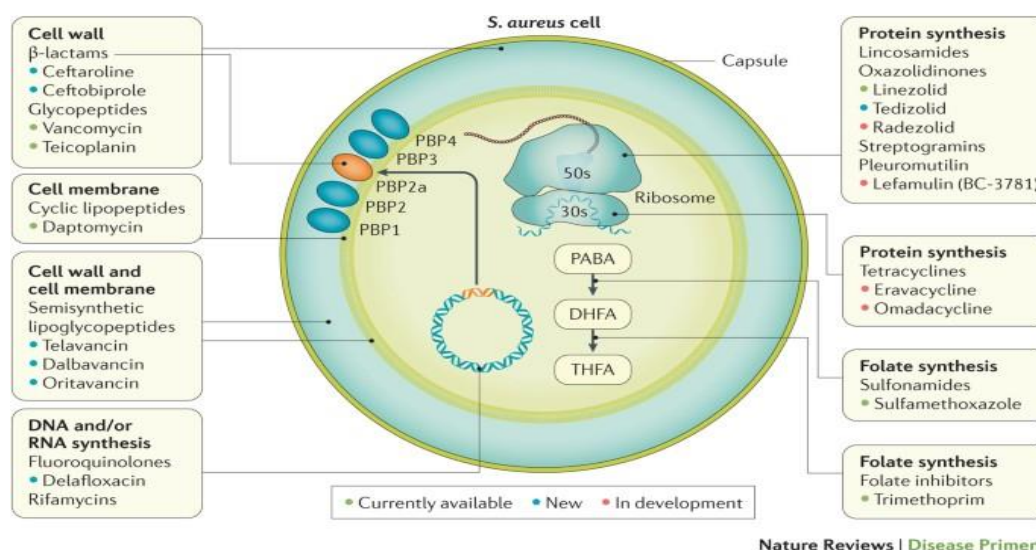
2.6.1. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva, faz parte da microbiota normal. Apesar disso continua sendo um dos mais importantes patógenos humanos como agente etiológico de uma variedade de manifestações clínicas infecciosas. Além disso, é comumente transmitido no ambiente hospitalar, na comunidade, e o tratamento, até o momento, continua sendo um desafio em função do aparecimento de cepas multirresistentes (LEE et al., 2016).

Em 1961, Jevons descreveu pela primeira vez a cepa de *S. aureus* resistente (Figura 9) ao antibiótico sintético Celbenin. Posteriormente novos casos surgiram como por exemplo: *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina associados aos cuidados de saúde (HA-MRSA) e *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA). Sabe-se que o mecanismo de resistência está relacionado às alterações das proteínas ligadoras de Penicilina (PBP), essa proteína pelo gene *MecA*, que transporta um elemento

genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico (SSCmec) o mesmo mecanismo também induz a resistência à vancomicina (VRSA) (HANZELMANN et al., 2016).

Figura 9. Mecanismo de ação dos antibióticos em *S. aureus* os antibióticos. Verde: antibióticos existentes; Azul: os novos antibióticos aprovados e disponíveis; Laranja os antibióticos em desenvolvimento.



Adaptado Lee et al. (2013).

2.6.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* faz parte da família *Enterobacteriaceae*. Este gênero é representado por cepas que colonizam o intestino dos mamíferos constituindo parte da sua microbiota normal (COSTA; CARDOSO, 2020).

A espécie *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa (Figura 11). Representa um importante grupo com subespécies potencialmente virulenta associada aos quadros diarreicos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroivasiva (EIEC), *E. coli* shigatoxigênica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* aderente difusa (ECAD) e *E. coli* aderente invasora (DAEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (MARQUEZ; BARRERA; DÍAS, 2019).

Todas as variantes de *E. coli* podem infectar diferentes sítios extra intestinais como: vias urinárias, pulmões, pele, meninges, vesícula biliar, bem como, formar biofilme em dispositivos médicos invasivos (SERVIN, 2014).

2.6.3. Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é constituído por 150 espécies, mas algumas são mais frequentes como patógeno humano: *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (ČERNÁKOVÁ et al., 2019).

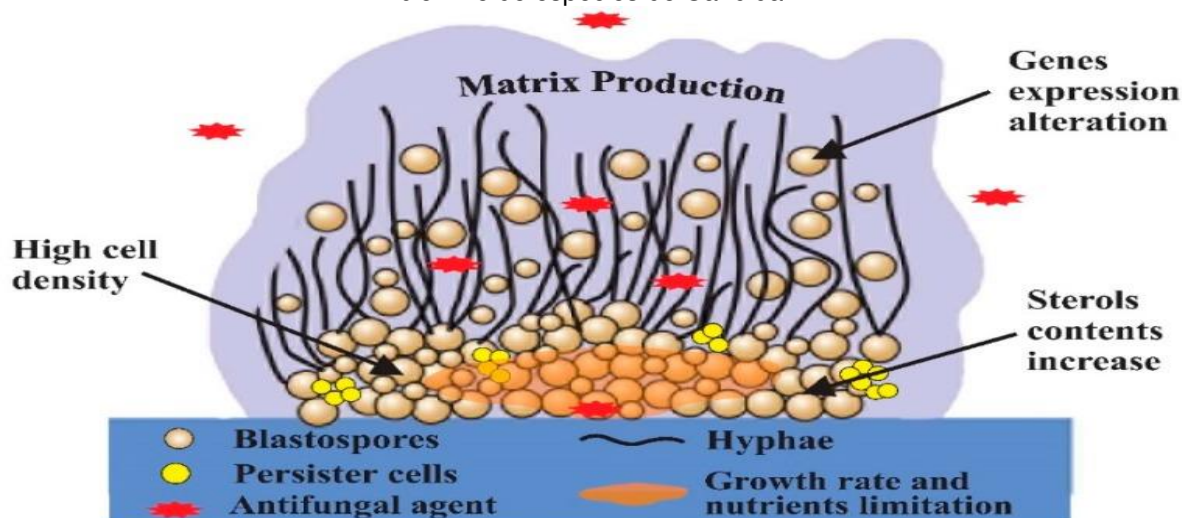
A *C. albicans* faz parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis e frequentemente é isolada de infecções oportunistas, principalmente, de indivíduos imunodeprimidos tais como os pacientes com câncer, transplantados, diabéticos, pacientes em pós-operatório, pacientes em antibioticoterapia, indivíduos em tratamento imunossupressor e gestantes (SANTOS; VIEIRA, 2017).

Diferente de *C. albicans*, a *C. krusei* é considerada um comensal transitório da mucosa humana e frequentemente está associada à candidíases de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. A infecção por *C. krusei* em pacientes imunocomprometidos evoluem para candidíase sistêmica e geralmente chegam a óbito (JAMIU et al., 2020).

Muitos fatores contribuem para a instalação do quadro infeccioso como: desequilíbrio do organismo como a mudança de pH, estresse, uso de medicamentos, obesidade. Além disso, o uso de cateter urinário, cateter venoso central, sonda nasogástrica, facilitam nos pacientes internados, a colonização e permanência das espécies de *Candida* no organismo devido o desenvolvimento de biofilme nessas superfícies abióticas. (Figura 11) (DADAR et al., 2018).

O Biofilme é uma comunidade de microrganismos organizado e incorporado a uma matriz exopolimérica que tem função de proteger a comunidade microbiana (LOHSE et al., 2018). A formação do Biofilme é um fenômeno sequencial que começa com o processo de adesão, seguido da maturação e proliferação das células leveduriformes (Figura 10). Nessa estrutura, observa-se o desenvolvimento de pseudohifas, e hifas que alongam e proliferam formando uma camada com células planctônicas e confere às espécies de *Candida* a sobrevivência e proteção em diversos ambientes (WALL et al., 2019). Devido a expressão de bomba de efluxo no biofilme, a resistência aos antifúngicos pelas espécies de *Candida* tem aumentado nos últimos anos (SILVA et al., 2017).

Figura 10. Esquema geral dos mecanismos descritos como envolvidos na resistência do biofilme de espécies de *Candida*.



Adaptado de Silva et al., (2017).

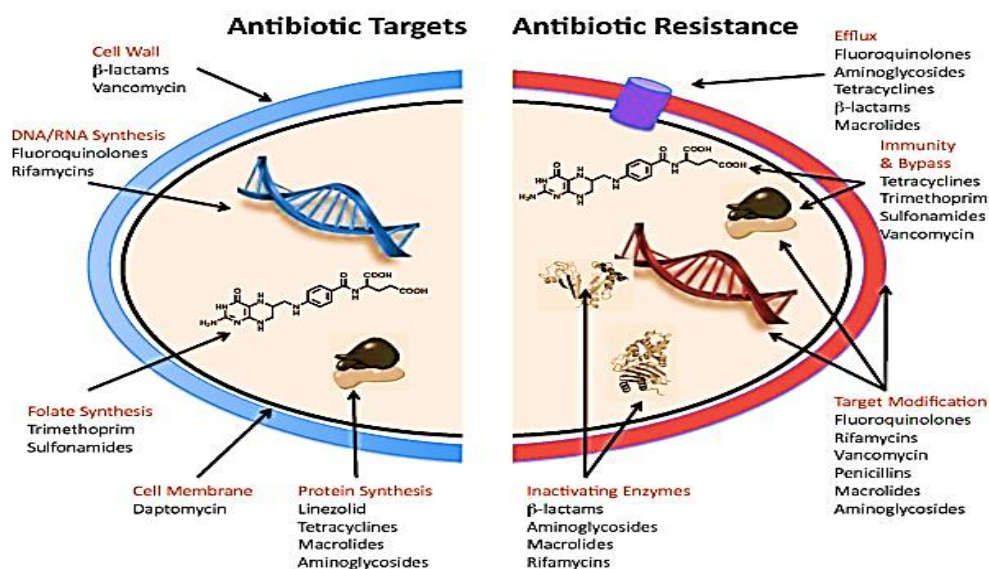
2.6.4 Resistências ao antimicrobianos

A resistência aos antibióticos e antifúngicos é um problema global. Aumenta o risco de morte dos pacientes com infecções fúngicas e bacterianas principalmente associada às doenças crônicas como o câncer. Investigar a atividade microbiana metabólitos secundários de fungos, permite um avanço com novas perspectivas para reduzir o aparecimento de cepas multirresistentes. Antibióticos e Antifúngicos são substâncias naturais ou sintéticas com ação no metabolismo do microrganismo, nas estruturas celulares e síntese da (ALMEIDA et al., 2020).

O mecanismo de ação dos antibióticos baseia-se em atingir a estrutura fisiológica e química da célula bacteriana inibindo o seu crescimento ou causando a morte. Cinco alvos podem ser atingidos: a parede celular, membrana celular, a síntese de proteínas, a síntese de DNA e RNA e o metabolismo do ácido fólico (Figura 11). No entanto, a pressão seletiva dos antimicrobiano estimula uma resposta bacteriana desencadeando uma série de mutações que refletem na resistência natural aos antibióticos (WRIGTH, 2010). Tais resposta é mediada pela produção várias enzimas que inativam os antibióticos, assim, a célula bacteriana utiliza de mecanismo

intrínsecos para a biossíntese de elementos que alteram sua estrutura celular e genética modificando seus próprios alvos. (KIM; MILHEIRIÇO; TOMASZ, 2017).

Figura 11. Alvos antibióticos e mecanismos de resistência



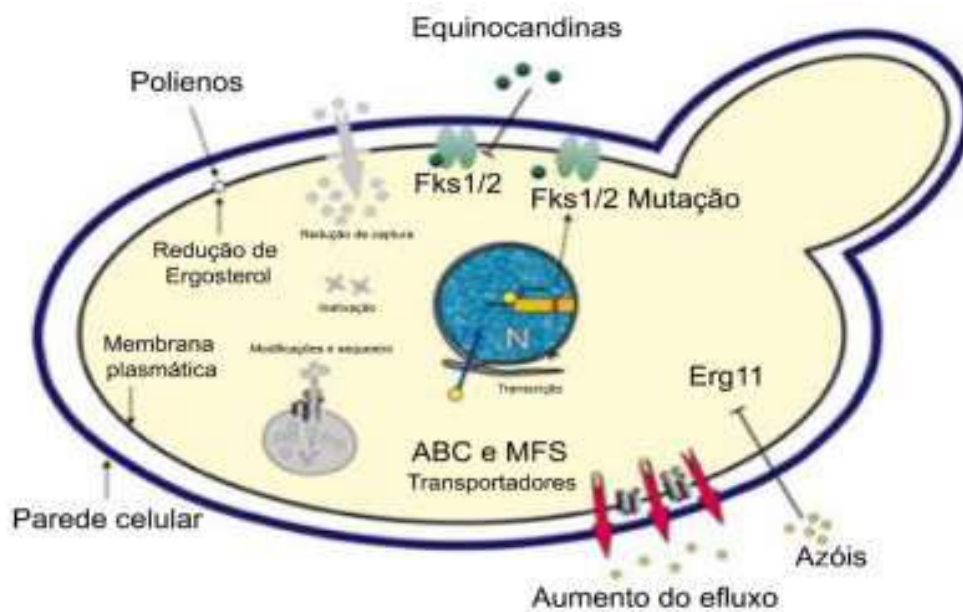
Adaptado de Wright, (2010)

A resistência antifúngica é um problema emergente que avança de forma global e influencia na manipulação do paciente, bem como na sua evolução clínica. Geralmente a ineficácia da terapêutica antifúngica ocorre mediante a incapacidade do paciente de responder a um ou mais de um antifúngico (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017) contribuindo assim, para a disseminação das espécies de *Candida*, em particular *C. albicans* e *C. krusei* resistentes aos azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e análogos de nucleosídeos (JAMIU et al., 2021).

De acordo com Bhattacharya; Sae-Tia; Sries, (2020) os mecanismos de resistências das espécies de *Candida* (Figura 12) que contribuem para a falha do tratamento são: biodisponibilidade das drogas em diferentes sítios de infecção; resposta imune do hospedeiro; formação de biofilme; a farmacocinética do medicamento, gravidade da infecção e efeitos colaterais às drogas antifúngicas, destacando-se Os mecanismo moleculares como, superexpressão de transportadores de membrana, composição da parede celular, biossíntese de ergosterol, também estão associados à evolução da resistência

antifúngica(TSCHERNER; SCHWARZMÜLLER; KUCHLER, 2011; ROCHA et al., 2021).

Figura 12 Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência do gênero *Candida* aos antifúngicos.



Adaptado de Tscherner, Schwarzmüller e Kuchler (2011).

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antioxidante, antitumoral e antimicrobiana dos metabólitos de dois isolados do gênero *Fusarium*.

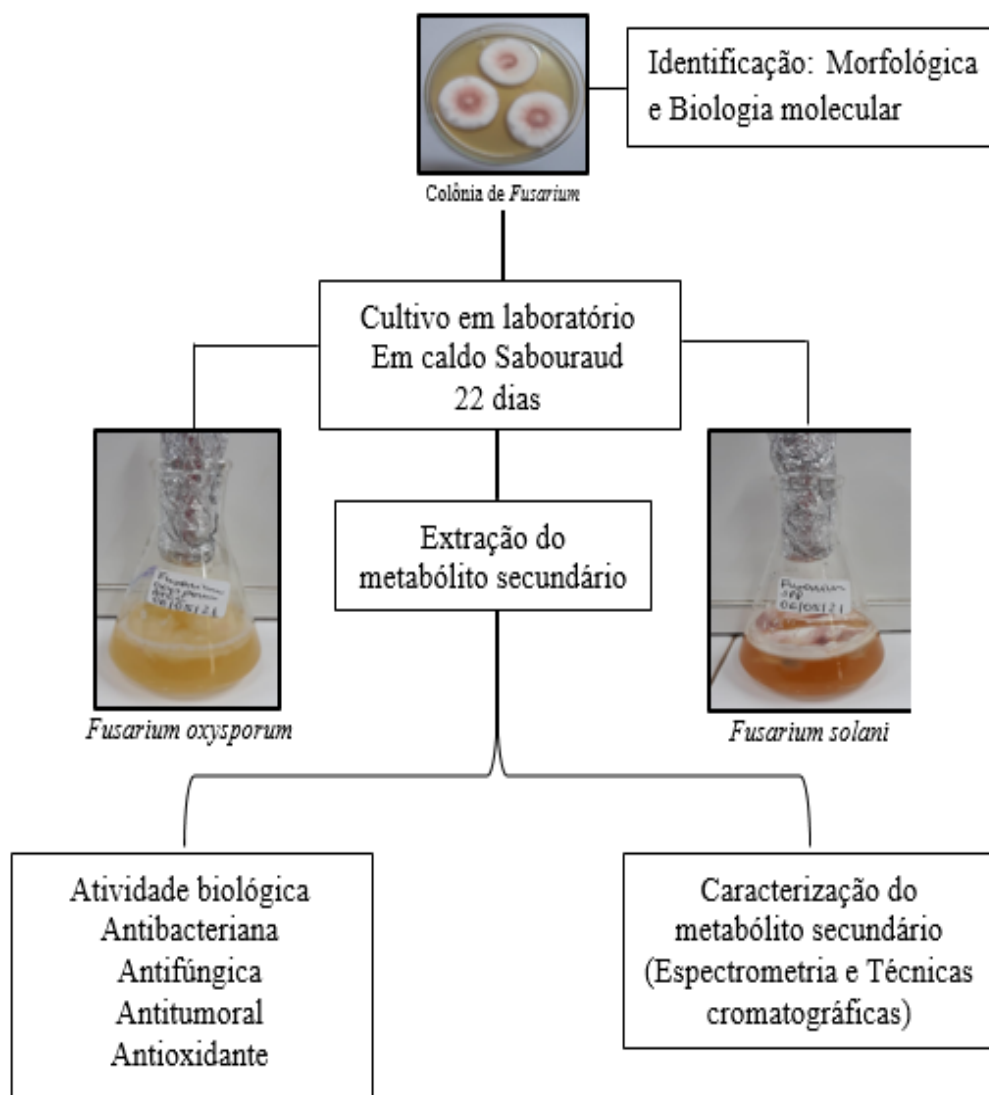
3.2 Específicos

- Identificar a espécie do gênero *Fusarium* por taxonomia clássica e biologia molecular;
- Realizar a identificação química dos metabólitos fúngicos;
- Determinar a atividade antioxidante pelo método DPPH;
- Avaliar atividade citotóxica dos metabólitos frente as linhagens tumorais MCF-7 (Adenocarcinoma de mama) e PNT (próstata normal);
- Analisar antimicrobiana frente cepas de *E. coli*; *S. aureus*, *C. albicans* e *C. krusei*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Screening* do estudo

Figura 13. Fluxograma do experimento: produção dos extratos metabólicos de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*.



Fonte Autora

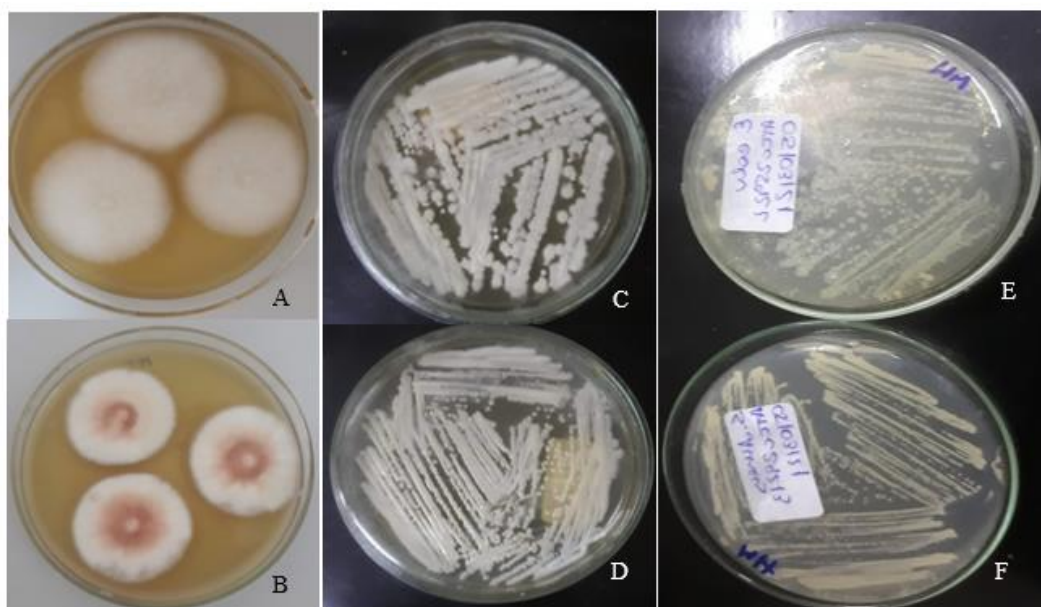
4.2. Cepas fúngicas e bacterianas utilizadas no estudo

4.2.1 Preparo das amostras

As espécies do gênero *Fusarium*, sendo uma cepa padrão IOC 3898 *Fusarium oxysporum* cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz e outra *Fusarium solani* isolada do ar. As cepas foram repicadas em Ágar Sabouraud-Dextrose (SDA) e incubados a 25°C por 7 dias. Após o período de crescimento foi realizada a análise macroscópica como: textura e coloração do anverso e reverso de cada colônia. Para as características microscópicas utilizou-se a técnica de microcultivo, seguindo os protocolos já existentes no Laboratório de Micologia do NIBA/DEPAT/ CCBS/UFMA.

Para os ensaios antimicrobianos utilizam-se as cepas padronizadas de *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida krusei* ATCC 6258, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 todos da coleção de Fungos da Universidade Federal do Maranhão no NIBA/DEPAT/CCBS (Figura 14).

Figura 14. Cepas fúngicas e bacterianas utilizadas nesse estudo.



A – *Fusarium oxysporum*; B- Cepa de *Fusarium solani*; C- *Candida krusei* ATCC 6258; D- *Candida albicans* ATCC 14053; E- *Escherichia coli* ATCC 25922; F- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Fonte: Autora.

4.2.2 Identificação por biologia molecular

4.2.2.1 Desenho de *Primers*

Após determinação das espécies que seriam utilizadas nesse estudo, foram selecionados os arquivos das sequências em formato *fasta* disponíveis no banco de dados GenBank.

Alguns parâmetros foram determinados para a escolha das sequências que amplificariam os genes: tamanho dos primers, temperatura, conteúdo GC e repetições, especificidade, entre outros (Tabela 3). O *software* utilizado para o desenho dos primers foi o *Primer 3*.

Tabela 3 - Sequência de primers espécie-específico e pares de base.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Amplicon</i>
FOX	F: 5'- ATGCGTTTCCTTCTGCTTATC -3'	182.3 pb
	R: 5'- AGGTGCGACATCAATGACAG-3'	205.2 pb
FSOL	F:5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	179 pb
	R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	178.6 pb

F= forward; R=reverse; FOX = *Fusarium oxysporum*; FSOL= *Fusarium solani*; pb= pares de base.

4.2.2.3 Extração de DNA

As cepas foram colocadas em tubos Falcon contendo esférulas de vidro e dissolvidas em *lysis fungal solution* (LFS) 1%. Foram agitadas em *vortex* por 5 minutos e colocadas em banho-maria a 65°C por uma hora. Foram adicionados 500 µl de tampão de lise e novamente agitadas em *vórtex* por 40 segundos. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm.

Foram adicionados 275 µl de acetato de amônio (pH 7) e as amostras foram incubadas por 5 minutos em banho-maria a 65°C. Após esse procedimento, foram incubadas em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 500 µl de fenol clorofórmio e as amostras centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm. 600 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubos de 2mL e

adicionou-se 1 ml de álcool isopropílico. Após agitação em *vórtex* por 5 minutos o sobrenadante foi descartado.

Foram adicionados 400 µl de etanol 70% e posterior centrifugação por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado por decantação sobre um papel de filtro. Após 24 horas as amostras foram dissolvidas em 50 µl de H₂O ultrapura e incubadas por 20 minutos a 37°C. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas. A pureza e a concentração do DNA foram determinadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c UV-Vis da *Thermo Scientific*TM. Quando as relações entre as densidades ópticas, A₂₆₀/A₂₈₀, foi igual ou maior que 1.7, o material foi considerado puro.

4.2.2.4 Reação da cadeia em polimerase (PCR)

As amplificações tiveram um volume final de 25 µl contendo DNA, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x, cada primers (*forward e reverse*), MgCl₂ e enzima Taq polimerase. As reações foram conduzidas em termociclador PCR 2720 Applied Biosystems. Para análise molecular serão utilizados primers da região do espaçador interno transcrito (ITS). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese para verificar se houve amplificação (Tabela 4).

Tabela 4 - Descrição dos ciclos de PCR realizados para espécies de *Fusarium*.

Desnaturação	Ciclos	Extensão
94 °C/5min	36 x (94 °C 60s / 60°C 60s / 72°C 30s)	72°C / 5 min

4.2.2.4 Eletroforese

Para a realização da eletroforese, foi pesado 1g de agarose. Em uma proveta foram medidos 40 mL de TBE 1X. A agarose foi então dissolvida em TBE 1X no *Erlenmeyer* que teve sua saída coberta com filamento. Essa solução foi levada ao micro-ondas por 1 minuto e 30 segundos. Ao término do tempo, o Erlenmeyer foi mexido vagarosamente até que a agarose fosse completamente dissolvida.

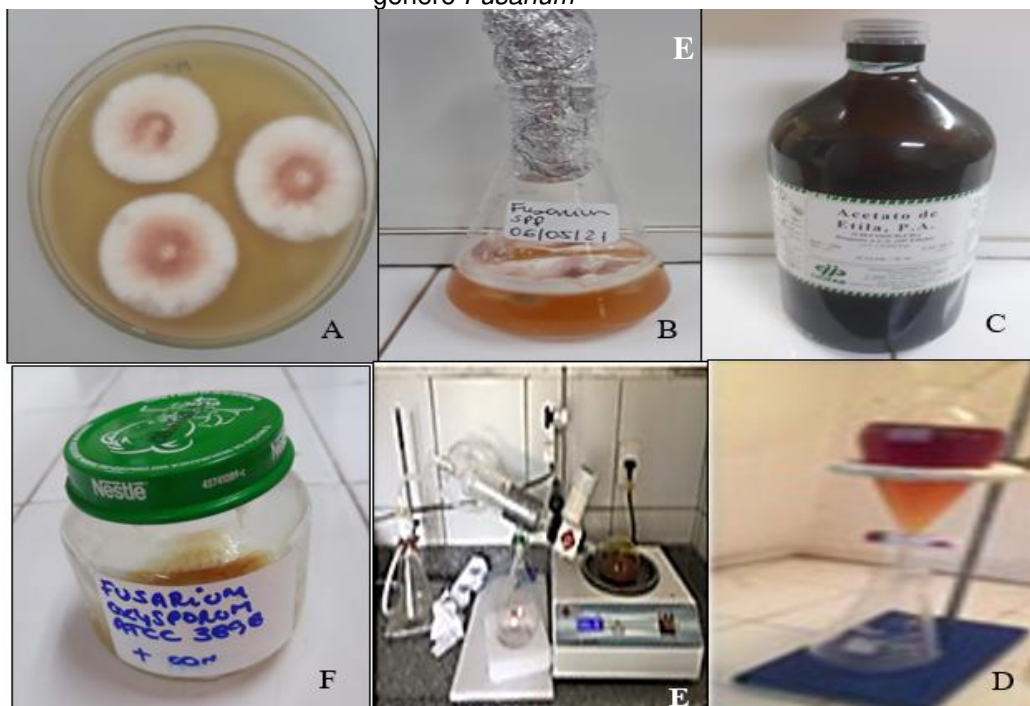
A solução foi aquecida novamente por 20 segundos. Foi acrescentado 3 μ l de brometo de etídio à solução de agarose. Foi despejado na cuba todo o volume da solução de agarose. Essa solução foi deixada polimerizando por 12 minutos.

Após essas etapas, foram misturados 5 μ l de cada produto de PCR e 3,5 μ l do corante *BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X)* (*Thermo Fisher Scientific*). Em seguida, foram pipetados 8 μ l dos volumes de cada uma das amostras nos poços do gel e 3 μ l de marcador *Ladder* separadamente. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel agarose a 2% a 90 V por 40 minutos em TBE 1X. Os produtos foram avaliados em transluminador quanto a sua quantidade e qualidade.

4.3 Obtenção dos metabólitos das espécies de *Fusarium*

O preparo dos metabólitos secundários (figura 15) foi realizado adicionando-se pequenos discos dos micélios, de aproximadamente 6 mm, em Erlenmeyer de 1.000 mL contendo 500 mL de Caldo Sabouraud Dextrose e incubados para fermentação durante 22 dias a 25 °C. Em seguida, o caldo fermentado foi separado da biomassa micelial, pelo processo de filtração. No caldo fermentado foi adicionado Etanol PA na proporção 1:2 deixado por um período de 24h, sendo filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 45°C. Para obtenção do metabólito de média/alta polaridade dos metabólitos produzidos pelo fungo, foi adicionado no metabólito concentrado acetato de etila (AcOEt) e particionado, após 24 horas, em funil de separação, separou-se a fase orgânica da fase aquosa, em seguida a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório, liofilizada e originado o extrato de (AcOEt).

Figura 15. Procedimento para extração do metabólito secundário de duas espécies do gênero *Fusarium*



A- Cultura de *F. solani* em meio sólido; B-cultura de *F. solani*; C-solvente; D- Separação da fase aquosa; E- Rotaevaporador; F-extrato obtido.

B- Fonte: Autora.

4.4. Caracterização química do metabólito secundário de *Fusarium solani* e *F. oxysporum*

4.4.1. Determinação das classes químicas dos metabólicos

Os metabólitos foram submetidos a testes químicos qualitativos baseados na metodologia apresentada por Matos (2009), para detecção de fenóis e taninos (reação com cloreto férrico); antocianinas, antocianidinas, flavonoides, catequinas e flavanonas (variação de pH utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio); flavonóis, flavanonas, flavonóis e xantonas (reação com magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado).

Os resultados obtidos em cada ensaio foram avaliados qualitativamente através de reações no desprendimento de colorações e na formação de precipitado. O teste de cruz foi adotado para determinação da Reação forte (+++), média (++) , fraca (+) e ausente (-) da classe química avaliada, conforme Matos (2009). A determinação de fenólicos totais nos metabólitos foi realizado através do método de Folin-Ciocalteu. Os resultados dos metabólitos foram

comparados com a curva padrão do ácido tânico, baseando-se em procedimentos descritos por Teles (2020).

O teor de fenólicos totais, foi determinado adicionando-se 0,5 mL de cada amostra de metabólito na concentração de 1000 µg/mL. Os mesmos foram adicionados a 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v). A mistura permaneceu em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. As leituras das absorvâncias a 760 nm foram realizadas com cubeta de quartzo, em espectrofotômetro. O equipamento foi aferido (“zerado”) utilizando etanol P.A. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após a leitura, calculou-se o teor de fenólicos totais de cada metabólito utilizando-se a equação de regressão $y = 0,006x + 0,006$, ($R^2 = 0,999$), obtida pela curva de calibração do ácido tânico.

A determinação de flavonoides totais foi realizada por regressão linear com comparação da curva padrão de quercetina nas concentrações entre 5 a 60 mg/mL, logo depois foi verificado a absorvância de 200 µL de cloreto de alumínio a 5% (m/v) em 3 mL do metabólito na concentração de 2000 µg/mL deixados a trinta minutos em ambiente escuro, após esse tempo as amostras foram lidas contra um branco (solução de 3 mL de água purificada com 200 µL de cloreto de alumínio 5%). A leitura foi realizada em Espectrofotômetro a 425 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Posteriormente foi calculado o teor de flavonoides pela equação de regressão $y = 0,0295x + 0,0936$, ($R^2 = 0,995$) obtida pela curva de calibração da quercetina.

4.4.2 Perfil cromatográfico dos metabólitos secundários

O perfil cromatográfico foi realizado em Cromatógrafo a Gás (CG-2010) acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM QP2010 Plus), ambos da Shimadzu, - Coluna capilar ZB-WAZplus (30m x 0,25mm x 0,25µm). Fluxo do gás de arraste, Hélio numa velocidade linear de 30 cm/sec e fluxo da coluna 1,0 mL/min. Programação do forno foi de 90 °C por 2 min com rampa de aquecimento de 5 °C/min até 180 °C, por 5 min e 240 °C, com aquecimento de 10 °C/min, permanecendo até 4 min. Temperatura do injetor e da fonte de íons de 250 °C e 200 °C, respectivamente. O modo de injeção Split com razão de 1/50. Tempo de Corrida 35 min. Modo de aquisição: *full Scan – m/z de 35 a 500*.

A Identificação foi realizada por normalização das áreas dos picos, Biblioteca do Equipamento NIST08 (National Institute of Standards and Technology). Esta análise foi realizada em parceria com o Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental (NCCA) da Universidade Federal do Maranhão.

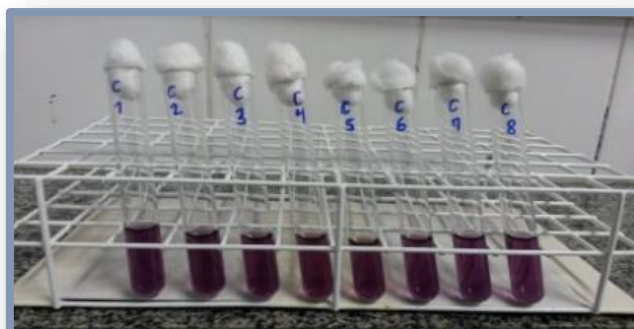
4.5. Atividade antioxidante

A atividade Antioxidante (figura 16) foi avaliada com base na capacidade sequestradora do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) por meio de reação pela ação dos antioxidantes presentes na amostra, de acordo com a metodologia descrita Brand-Willians e Berset (1995) com modificações segundo (TELES et al., 2020). Uma alíquota (30µL) das amostras dos metabólitos secundários, foram misturadas com 3,0 mL de solução de DPPH na concentração de 40 µg/mL⁻¹. Foram preparadas da mesma forma as soluções denominadas controle, porém substituindo-se 30µL da amostra por etanol. A solução denominada Branco foi utilizada solvente etanol PA. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, o grau de descoloração do radical DPPH foi medido através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. As absorbâncias obtidas foram convertidas em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) através da equação descrita abaixo (MENSOR et al, 2001):

$$AA\% = 100 \{ [Absa - Absb] \times 100 \} + Absc$$

Onde: AA%: atividade antioxidante em porcentagem; Absa: absorbância da amostra (metabólito secundário); Absb: absorbância do branco; Absc: absorbância do controle.

Figura 16. Ensaio de atividade antioxidante dos metabólitos secundário de *F. oxysporum* e *F. solani* pelo método DPPH.



4.6 Atividade citotóxica

4.6.1 Linhagens tumorais

A atividade dos metabólitos secundários de *F. oxysporum* e *F. solani* avaliada nas células tumorais humanas de adenocarcinoma mamário - MCF7 e célula normal de próstata- PNT Laboratório de Cultura de Célula (LCC) do Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto. As linhagens foram mantidas em meio de cultivo conforme o respectivo protocolo da *American Type Culture Collection*.

4.6.3 Citotoxicidade determinada pelo método do MTT (diferentes concentrações do metabólito secundário)

As células foram mantidas em garrafa de cultura até a formação e fechamento da monocamada, em seguida serão tripsinizadas e separadas em tubo falcon imersos em gelo. O número de células será contado em câmara de Neubauer a partir de uma diluição de 1:2 de suspensão celular (10µL suspensão celular + 10 µL de tripan azul).

As células foram cultivadas em placa de 96 poços por 24 horas para formar a monocamada. Foram adicionados 100 µL da solução com densidade de inoculação conforme a linhagem utilizada (1×10^4 – 6×10^4). Após 24hs, foram adicionados 100 µL das concentrações do metabólito secundário em diferentes concentrações de 31,2 até 1000µg/mL, em triplicata. Após 24 e 48 horas de tratamento, 200 µL de meio novo contendo 10 µL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi adicionado à cultura. As células foram reincubadas em estufa de CO₂ por 3 horas protegidas da luz.

Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados a cada poço. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) utilizando um comprimento de onda de 538 nm.

4.7 Atividades Biológicas dos metabólitos secundários

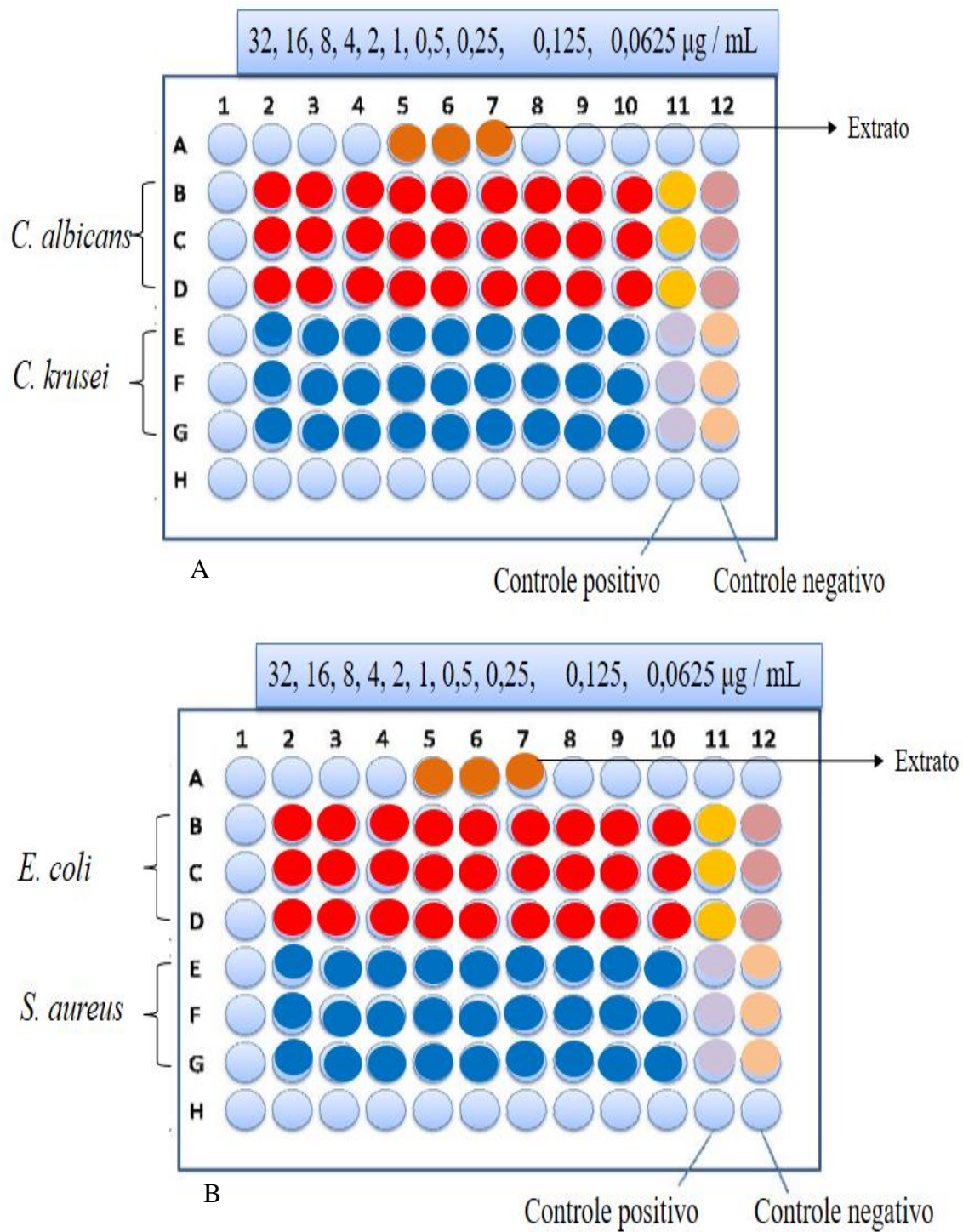
Inóculos de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *Candida albicans* ATCC 14053 e *Candida krusei* ATCC6253 foram preparados pela transferência de 2 a 3 colônias para tubos contendo 3 ml de solução salina estéril. Posteriormente, foram padronizados comparando suas absorvâncias com a absorvância da escala 0,5 de MacFarland (1×10^8 UFC / ml) em um leitor de microplacas ELISA (Biotek). Para as leveduras *Candida albicans* ATCC 14053 e *Candida krusei* ATCC6253, foi realizado o mesmo procedimento, porém, foi feita uma diluição 1:50 com Braind and Heart Infusion Broth (BHI) para obter uma suspensão contendo aproximadamente $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por ml, de acordo com o (CLSI, 2015).

Nas microplacas de 96 poços (Figura 17), 180 µl de solução de metabólito em caldo BHI para as bactérias e RPMI 1640 para leveduras em diferentes concentrações (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 µg / mL) foram dispensados nos poços, respectivamente. Em seguida, foram adicionados aos poços 20 µL do inóculo das bactérias e fungos testados (CLSI et al., 2015 com adaptações). Os controles positivos foram preparados dispensando 180 µl de gentamicina a uma concentração de 10 µg / ml (para bactérias gram-negativas), vancomicina a 8 µg / ml (para bactérias Gram-positivas) e anfotericina B a 16 µg / ml (para as leveduras), e em seguida foram adicionados 20 µl do inóculo dos microrganismos testados a seis poços, respectivamente. Os controles negativos consistiram em 180 µl de caldo Mueller-Hinton, para a bactéria, e RPMI1640 para os fungos e 20 µl de caldo bacteriano e fúngico. As microplacas foram então incubadas a 37 ° C durante 24 horas. Após a incubação, a absorvância foi medida a 500 nm em um leitor de microplacas Biotek. As porcentagens de inibição do crescimento em diferentes concentrações do metabólito para cada microrganismo foram calculadas:

$$\% \text{ De inibição de crescimento} = [1 - (A_c / A_0)] \times 100$$

onde A_c representa a absorvância do poço com o metabólito em uma dada concentração do metabólito percentual foi calculado e plotado com as concentrações testadas para proporcionar a concentração que inibiu 50% do crescimento (IC50).

Figura 17. Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços.



A- Atividade antifúngica; B- atividade antibacteriana.

4.8. Análise estatística

Para análise estatística dos dados, foi realizado o teste one-way análise de variância (ANOVA), seguido pelos pós-testes de Tukey`s. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. O programa utilizado para a realização da análise estatística foi o GraphPad Prisma (versão 9.0)

Para determinação de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante foi realizado o teste de regressão linear.

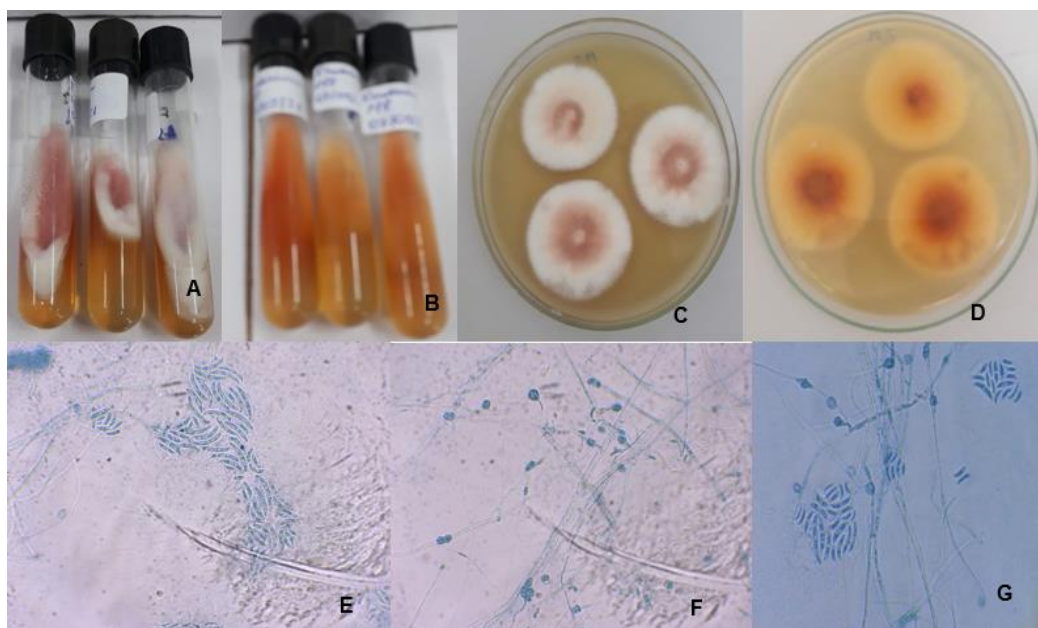
5. RESULTADOS

5.1 Taxonomia de *Fusarium solani* isolado do Ar e identificação por biologia molecular.

Um espécime do gênero *Fusarium* isolado do ar da Universidade Federal do Maranhão foi objeto de estudo nesta pesquisa. A colônia apresentou característica algodonosa, crescimento rápido variando entre 4 a 5 dias, inicialmente branca. Entre 5 a 7 dias a colônia apresentou pigmento variando de salmão (Fig. 18: A, B, C e D). Na microscopia observa-se macroconídios fusiforme, curvo contendo entre 3 a 5 septos; clamidósporos hialinos, globosos, de paredes lisas e rugosas, isolados e em pares em ramos curtos de hifas laterais ou intercalares (Fig. 18: E, F e G).

As características as morfológicas observadas ao microscópio foram compatíveis com a espécie *Fusarium solani*.

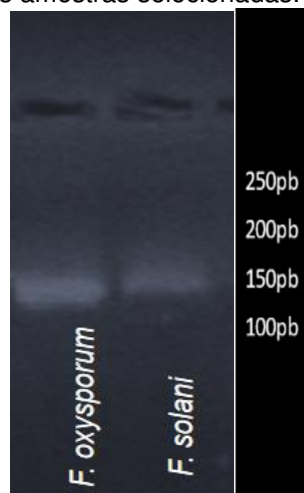
Figura 18. Macroscopia e microscopia de *Fusarium solani* isolado do ar.



A e B – Cultura em tubo em meio Ágar Sabouraud; **C e D** – Cultura em placa em meio Ágar Sabouraud; **E, F e G**- Microcultivo 40X microscópio Biotika B20.

A análise por PCR mostrou que o isolado do ar foi compatível com *Fusarium solani* (Figura 19).

Figura 19. Gel de eletroforese visualizado em transluminador demonstrando a amplificação das amostras selecionadas.



5.2 Análise das atividades antioxidante, antitumoral e antimicrobiana dos do metabólito das espécies de *Fusarium*

Os metabólitos de *F. oxysporum* e de *Fusarium solani* foram submetidos à análise das classes químicas, espectrometria e atividades: antioxidante, antitumoral contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) células PNT (célula normal de próstata), antifúngica contra as espécies de *C. albicans* e *C. krusei* e antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. Os dados estão descritos em tabelas e figuras abaixo.

5.2.1 Atividade antioxidante

Na tabela 5 e na figura 20 estão os valores da concentração eficiente ou CE50% representando a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH como pode ser e Tabela 5.

Tabela 5. Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH, expressa como CE₅₀,

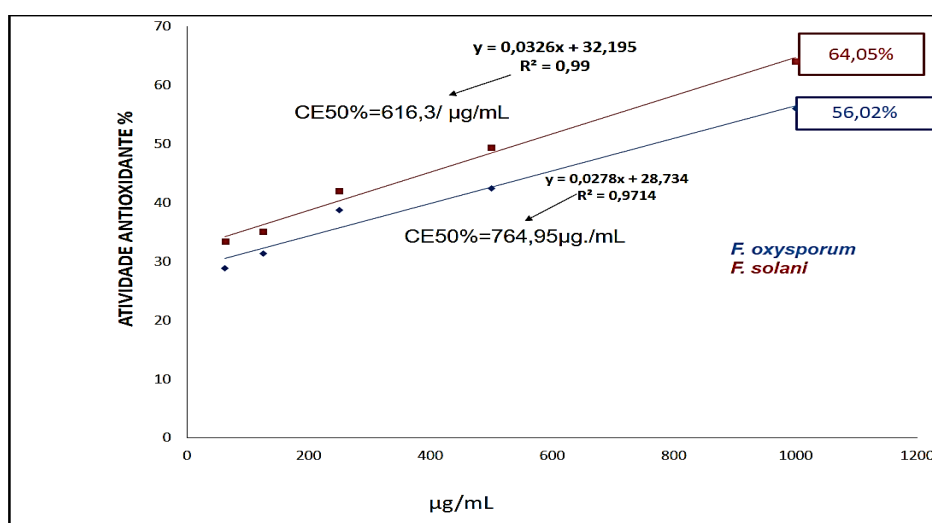
Metabólito de fungo	DPPH CE ₅₀ (µg/mL)
<i>Fusarium oxysporum</i>	764,964
<i>Fusarium solani</i>	616,2865

Fonte: Autora

A Figura 20, descreve a atividade antioxidante (%) e a concentração do metabólito secundário de *Fusarium solani*. (A) e *F. oxysporum* (B) pelo método DPPH. Nota-se na figura 20 os valores pela equação da reta ($y = 0,0326x + 32,195$), com um $R^2=0,990$, para *Fusarium solani*, enquanto que a equação da reta ($y = 0,0278x + 28,734$), com um $R^2=0,971$ para *Fusarium oxysporum*.

Observa-se que o metabólito de *F. oxysporum* forneceu um CE₅₀ de 764,964 µg/mL⁻¹ já o metabólito de *Fusarium solani*. CE₅₀ de 616,2865 µg. mL⁻¹ que é a concentração da suspensão do metabólito necessária para atingir 50% de atividade antioxidante. De acordo com a Figura 21 o metabólito demonstrou atividade antioxidante.

Figura 20. Curva da porcentagem de atividade antioxidante dos metabólitos secundários de *Fusarium solani* isolado do ar e *Fusarium oxysporum*.



5.2.2 Determinação das classes químicas nos metabólitos secundários

Nos dois metabólitos secundários de *Fusarium solani* e *F. oxysporum* foram identificadas as classes químicas compatíveis com fenóis, alcaloides e flavonoides os mais representativos (Tabela 6). Esses dados demonstram que os metabólitos têm alta efetividade na extração das classes químicas testadas. No entanto, nota-se que o metabólito de *Fusarium solani* apresentou reação forte para presença de fenóis e média para alcaloides, enquanto que o de *F. oxysporum* apresentou a reação média para as classes Fenóis, Flavonas, Flavonóis, Xantonas e Flavononas. E só foi verificado a presença de Triterpenóides pentacíclicos livres no metabólito secundário de *Fusarium solani*.

Tabela 6. Classes de químicas presentes nos metabólitos secundários de *F. oxysporum* e *F. solani*.

Classes de metabólitos	Metabólito <i>F. oxysporum</i>	Metabólito <i>Fusarium solani</i>
Fenóis	++	+++
Alcaloides	+	++
Taninos condensados	+	+
Taninos hidrolisáveis	+	+
Flavonas, flavonóis e xantonas	++	+
Chaconas e auronas	+	+
Catequinas	+	+
Flavononas	++	+
Triterpenóides pentacíclicos livres	-	+
Saponinas	+	+

Reação forte (+++), média (++) , fraca (+) e ausente (-), segundo Matos (2009),
Fonte: Autora

5.2.1 Teor Fenólico totais

Com relação ao teor de compostos fenólicos totais nos dois metabólitos foi observado uma variação de 84,22 a 88,52 mg EAT.g⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7. Teor de Fenólicos presentes nos metabólitos secundários de *F. oxysporum* e *F. solani*.

metabólito de fungos	Fenólicos (mg EAT.g ⁻¹)
<i>Fusarium solani</i> .	88,52174
<i>Fusarium oxysporum</i>	84,22222

EAT: equivalente ácido tânico. Fonte: Autora

5.2.2 Teor de Flavonoides totais

O teor de flavonoides totais dos metabólitos variou de 0,819 a 1,011 mg EQ. g⁻¹ (Tabela 8).

Tabela 8. Teor de Flavonoides totais presentes nos metabólitos secundários de *F. oxysporum* e *F. solani*.

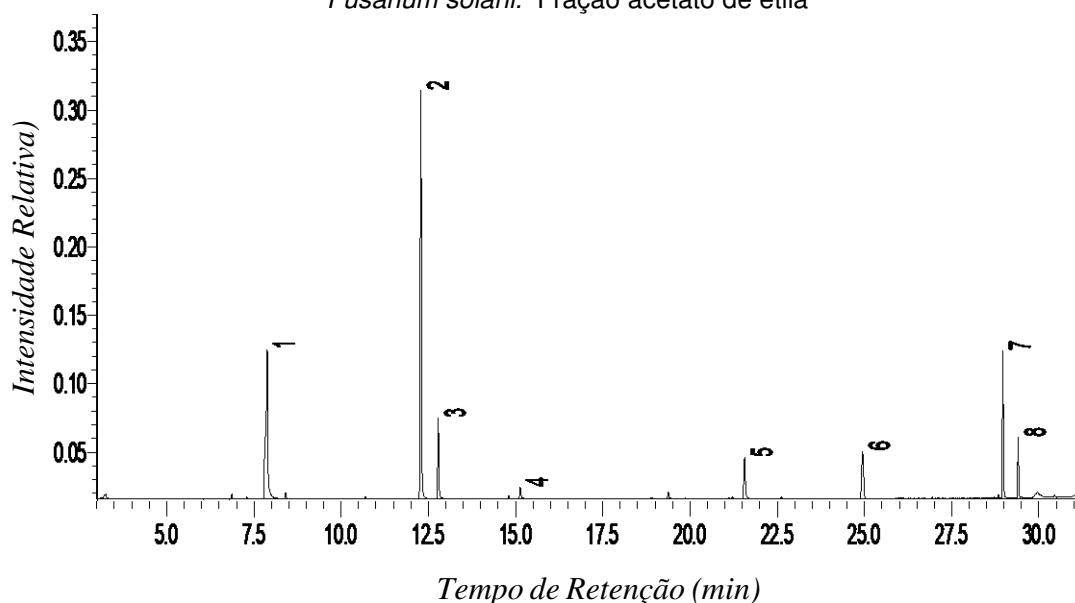
Metabólito de fungos	Flavonoides (mg EQ.g ⁻¹)
<i>Fusarium solani</i>	0,819931
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,011494

Fonte: Autora

5.3 Perfil cromatográfico do metabólito secundário de *F. solani*

O perfil cromatográfico da fração acetato de etila do metabólito de *Fusarium solani* como demonstrado abaixo (Figura 21).

Figura 21. Perfil cromatográfico da fração acetato de etila do metabólito secundário de *Fusarium solani*. Fração acetato de etila



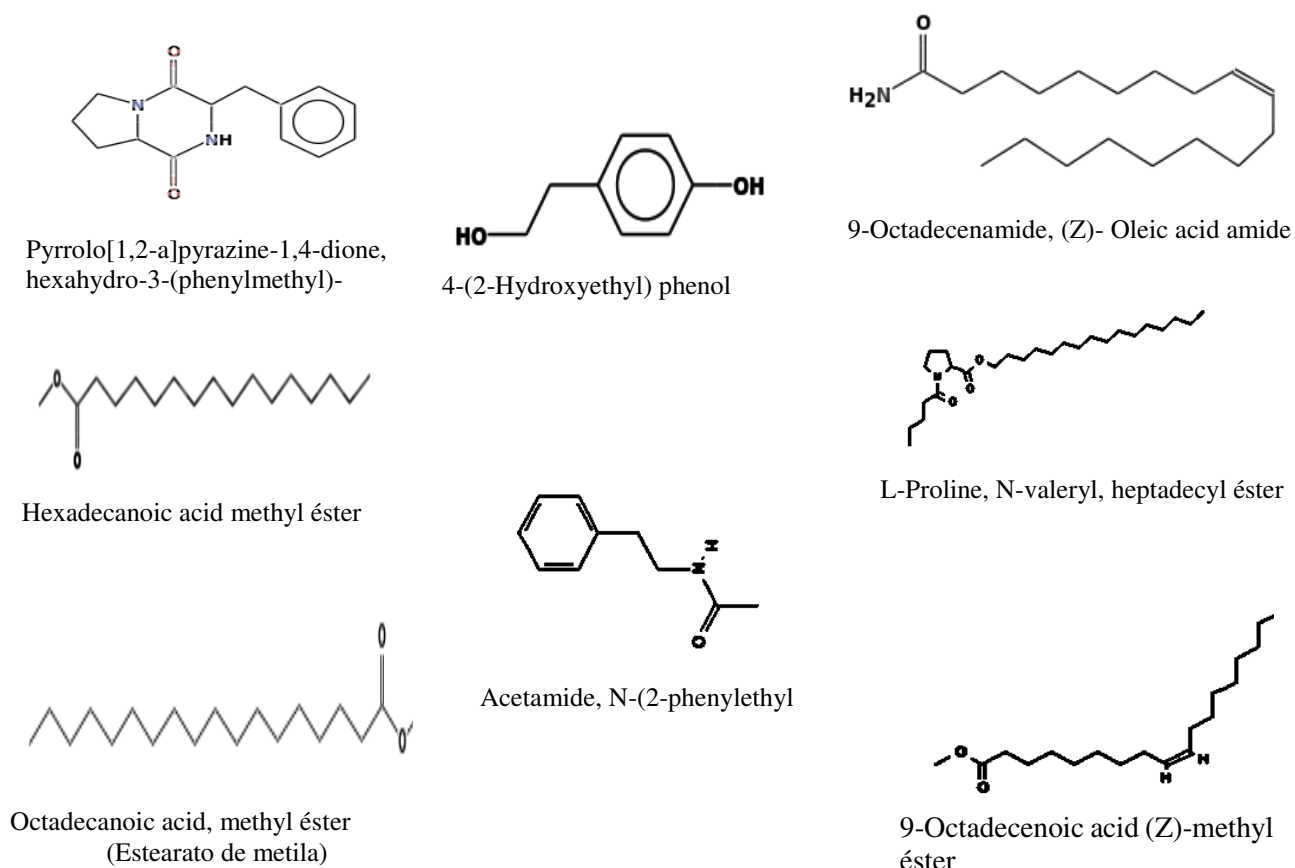
O perfil cromatográfico de *Fusarium solani* revelou a presença de vários compostos químicos, dentre os quais destacam-se 4-(2-Hydroxyethyl) phenol, L-Proline, N-valeryl, heptadecyl, Hexadecanoic acid methyl éster, 9-Octadecenoic acid (Z)-methyl éster como majoritários (Tabela 9).

Tabela 9. Compostos identificados no metabólito secundário *Fusarium solani* -Biblioteca NIST08. Fração acetato de etila.

Compostos químicos identificados	Picos	% de área	Tr (min)
4-(2-Hydroxyethyl) phenol	01	2,90	12.273
Acetamide,N-(2-phenylethyl	02	6,7	14.291
L-Proline, N-valeryl, heptadecyl éster	03	10,39	21.934
Hexadecanoic acid methyl éster	04	17,99	24.941
9-Octadecenoic acid(Z)-methyl éster	05	20,03	28,964
Octadecanoic acid, methyl éster (estearato de metila)	06	12,18	29,405
9-Octadecenamida, (Z)-Oleic acid amida	07	14,97	32,456
Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexadro-3-(phenylmethyl)-	08	14,57	32.612

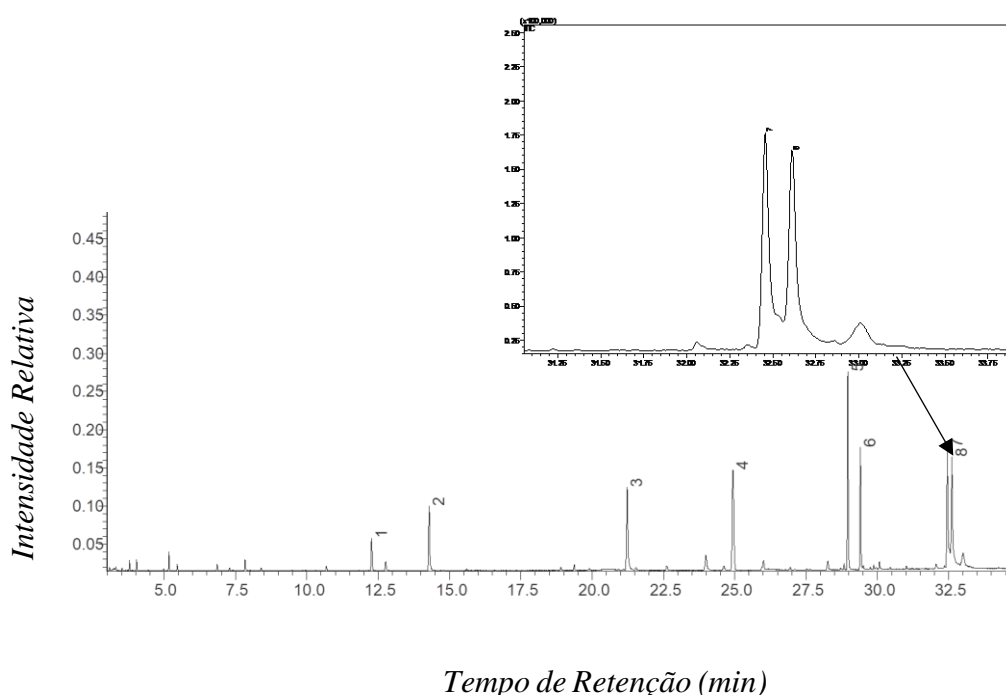
Na Figura 22 demonstra-se os compostos químicos identificados na fração acetato de etila do metabólito de *Fusarium solani* bem como suas respectivas estruturas químicas.

Figura 22. Compostos químicos identificados na fração acetato de etila do metabólito de *Fusarium solani*. Estrutura química identificada nesse estudo e acessada no site <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>.



Na Figura 23 destaca-se o perfil cromatográfico da fração diclorometano do metabólito de *Fusarium solani*.

Figura 23. Perfil cromatográfico da fração diclorometano do metabólito de *Fusarium solani*.



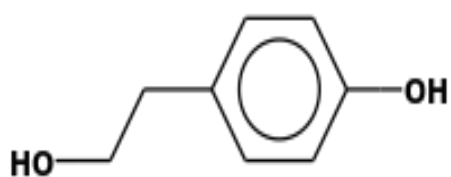
A Tabela 10 Demonstra-se a os compostos químicos identificados na fração diclorometano de *Fusarium solani*.

Tabela 10. Compostos presentes no metabólito secundário de *Fusarium solani*. Biblioteca NIST08. Fração Diclorometano.

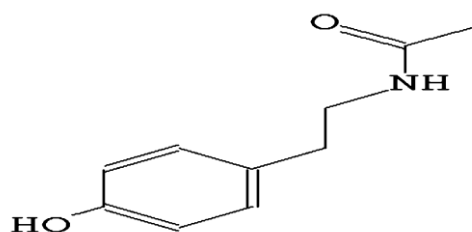
Compostos químicos identificados	Picos	% de área	Tr (min)
Benzeneacetic acid, Acetic acid, phenyl-	01	24,1	7.882
4-(2-Hydroxyethyl) phenol	02	37,57	12.283
N-Butylacetamide	03	7,26	12.784
Acetic acid, (p-hydroxyphenyl)-	04	0,95	15.128
Acetamide, N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-	05	4,97	21.564
Hexadecanoic acid, methyl ester, (Palmitato de metila)	06	7,25	24.945
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (Oleato de Metila)	07	12,80	28.966
Octadecanoic acid, methyl ester(Estearato de metila)	08	5,04	29.406

Na Figura 24 encontram-se os compostos químicos identificados na fração diclorometano do metabólito de *Fusarium solani*, bem como suas estruturas químicas

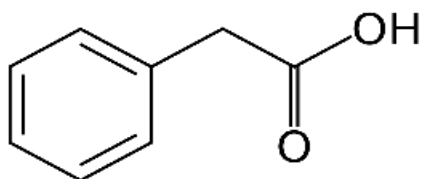
Figura 24. Compostos químicos identificados na fração diclorometano do metabólito secundário de *Fusarium solani*. Estrutura química identificada no site <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound> (2021).



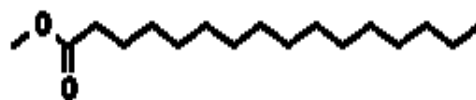
4-(2-Hydroxyethyl) phenol



Acetamide, N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-



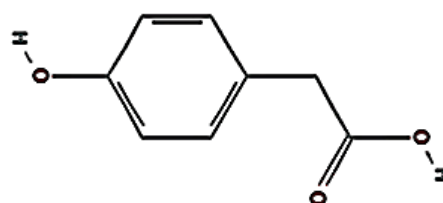
Benzeneacetic acid, Acetic acid,



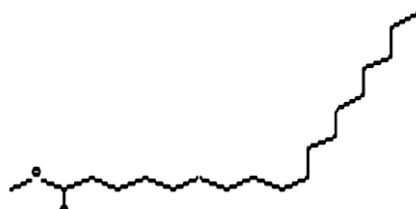
Hexadecanoic acid, methyl ester,
(Palmitato de metila)



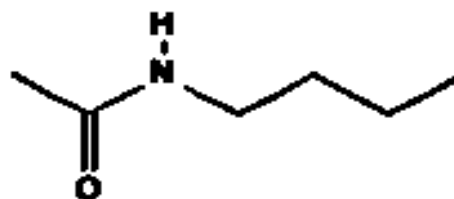
Octadecanoic acid, methyl ester
(Estearato de metila)



Acetic acid, (p-hydroxyphenyl)-



9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester
(Oleato de Metila)



N-Butylacetamide

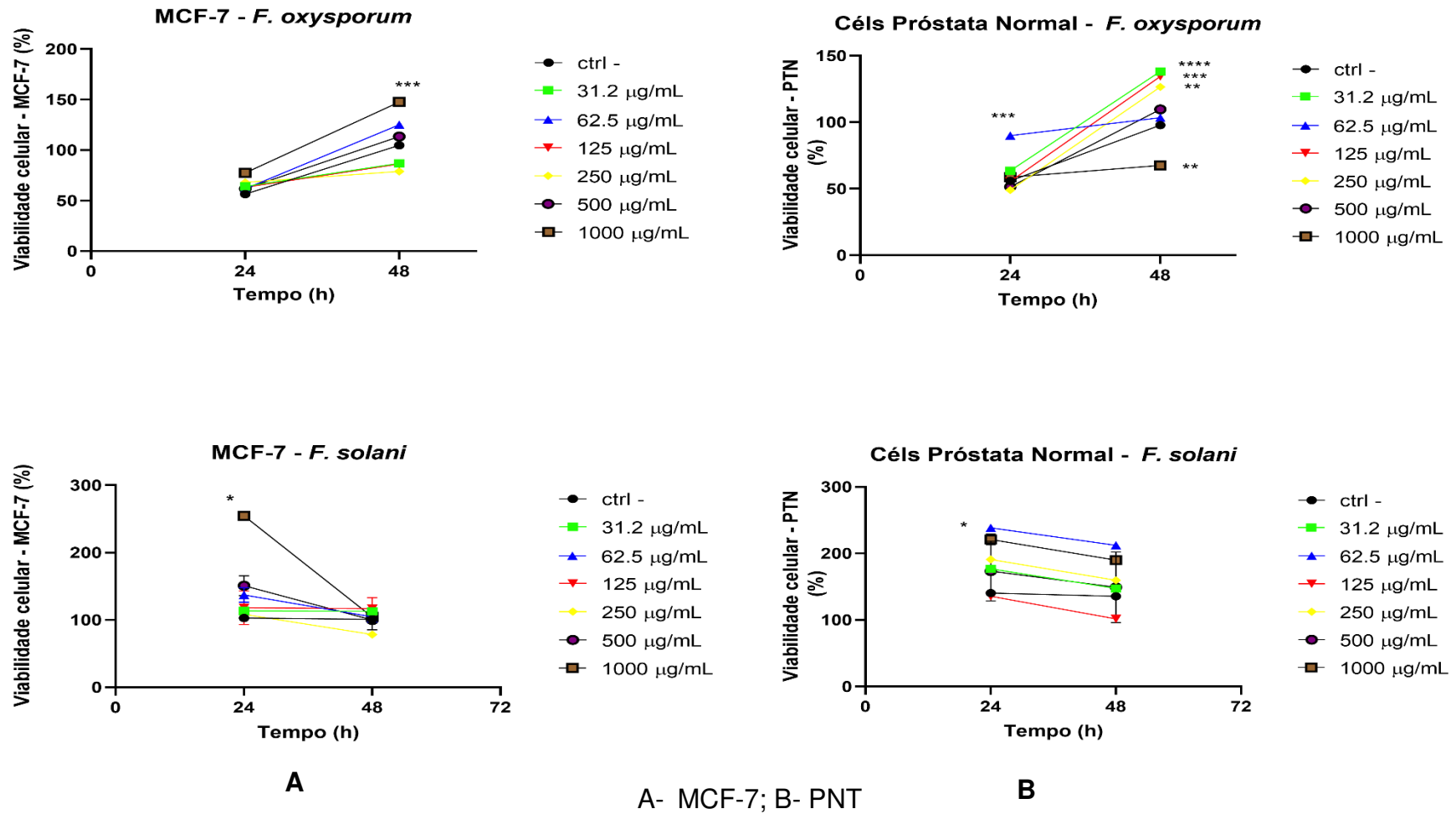
5.3 Atividade antitumoral

O efeito citotóxico dos metabólitos secundários foi analisado através do ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em duas linhagens celulares, sendo MCF-7 derivada de um adenocarcinoma mamário e PNT derivada de próstata normal (Figura 25).

Os dados referentes ao tratamento do metabólito de *F. oxysporum*, na viabilidade celular, mostraram um efeito proliferativo em célula de adenocarcinoma mamário - MCF-7 na concentração 1000 µg/mL em 48hs, e para célula normal de Próstata, a concentração de 1000 µg/mL foi citotóxico quando comparado ao controle negativo em 48hs.

Para os metabólitos secundário de *Fusarium solani* mesmo não sendo significativo, houve um declínio na viabilidade celular na concentração 1000 µg/mL em 24hs (Figura 24A). Para as células de próstatas, o metabólito de *Fusarium solani* não ocasionou redução da viabilidade celular nos tempos analisados 24 e 48hs (Figura 25B).

Figura 25. Avaliação da citotoxicidade dos metabólitos secundários de *F. oxysporum* e *Fusarium solani* em linhagens de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e linhagens célula normal de próstata PNT.



5.4. Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários

Conforme os dados obtidos, os dois metabólitos tiveram efeito antibacteriano (Figura 25) e antifúngico (Figura 26), porém algumas variações relacionadas com relação ao tempo e espécies foram observadas.

No ensaio antibacteriano, percebemos que a bactéria *E. coli* foi sensível a todas as concentrações testadas, ocorrendo redução significativa ($p < 0,0001$) da viabilidade em 24 e 48hs (Figura 25 A).

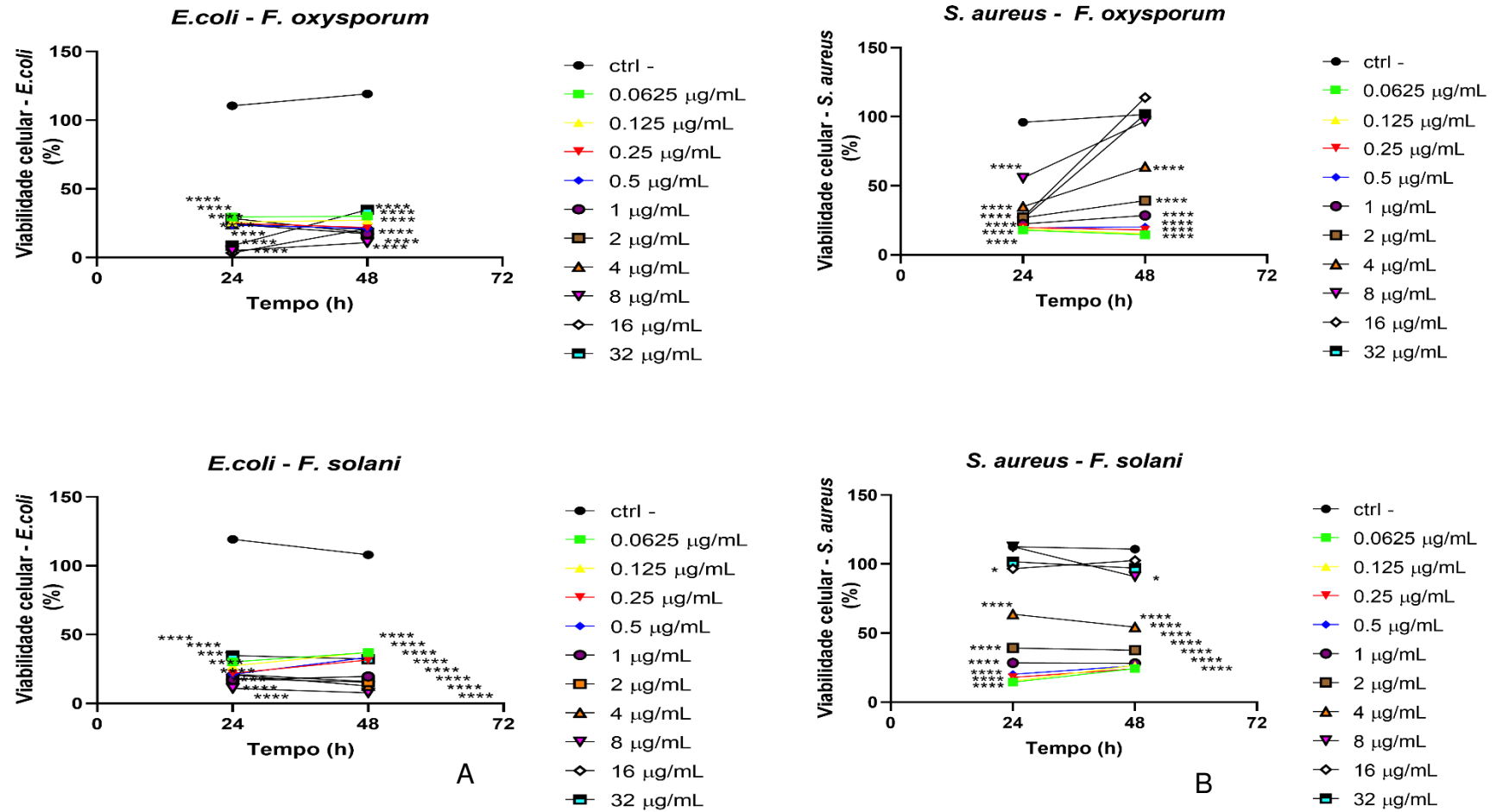
Houve diferença entre os metabólitos para o ensaio com a bactéria gram-positiva *S. aureus*. Percebe-se que o metabólito de *Fusarium oxysporum*, em 24hs reduziu significativamente ($P < 0,0001$) a viabilidade celular quando comparado ao controle negativo em todas as concentrações analisadas. Em 48hs também houve redução da viabilidade celular nas concentrações de 0,0625 até 8 $\mu\text{g/mL}$. Observa-se uma tendência de proliferação nas concentrações de 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$ comparado ao controle negativo o que pode ser explicado pela densidade dos metabólitos analisados (Figura 26B).

Da mesma forma, foi observado que *Fusarium solani* em 24hs também reduziu a viabilidade celular em todas as concentrações em *S. aureus*. Em 48hs que houve redução da viabilidade celular em todas as concentrações, porém não houve redução significativas nas concentrações 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$ comparada ao controle (Figura 26B).

Em *Candida albicans*, o metabólito de *Fusarium oxysporum* em 24hs, reduziu a viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Já em 48hs, com exceção das concentrações 8, 16 e 32, houve redução da viabilidade celular. Para o metabólito do *Fusarium solani* houve redução significativa ($p < 0,0001$) em todas as concentrações analisadas (Figura 26 A).

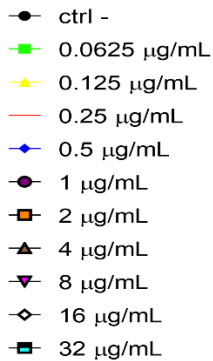
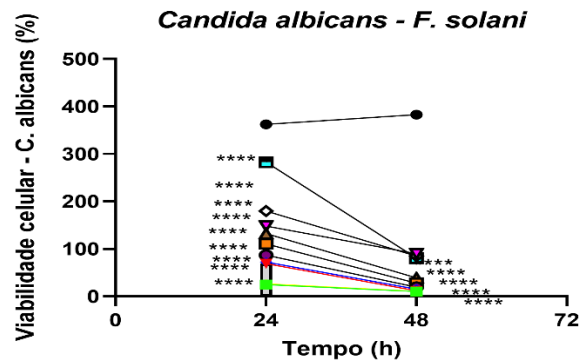
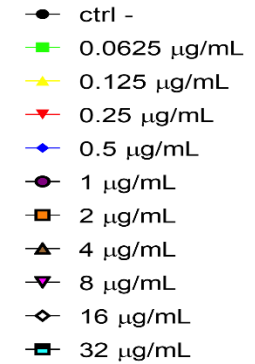
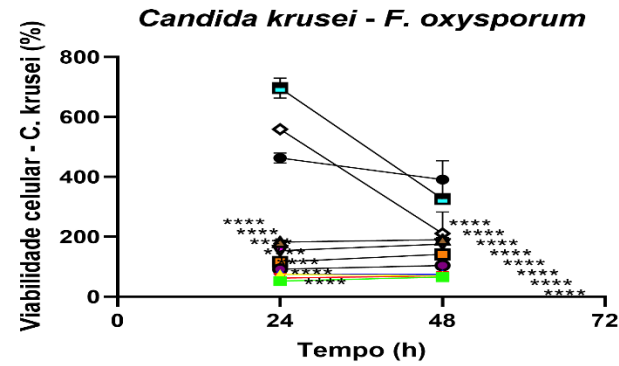
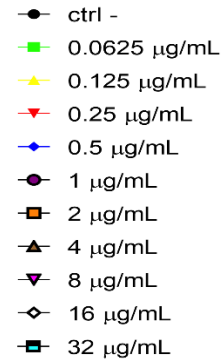
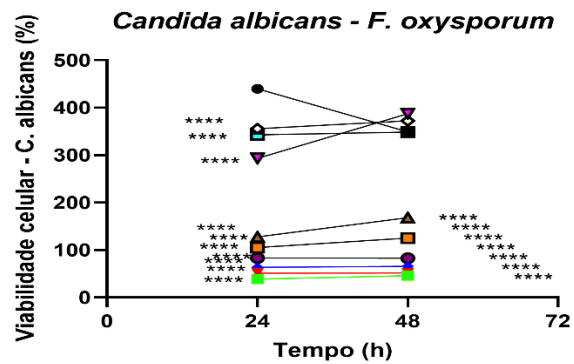
A respeito da *Candida krusei*, o metabólito do *Fusarium oxysporum* reduziu significativamente ($p < 0,0001$) nas concentrações 0,625 até 8 em 24hs. E em 48hs, com exceção da concentração 32 $\mu\text{g/ml}$, houve redução significativa ($p < 0,001$) comparada ao controle negativo. O metabólito do *Fusarium solani*, em 24hs, ocasionou da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração 32 $\mu\text{g/ml}$. Em 48hs, também houve redução em todas as concentrações testadas (Figura 26 B).

Figura 26. Atividade antibacteriana dos metabólitos secundários *F. oxysporum* e *Fusarium solani* em cepas de *E. coli* e *S. aureus*

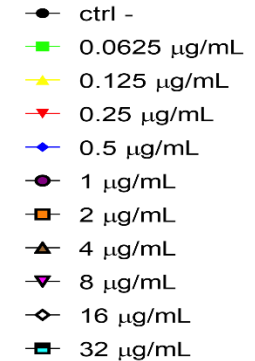
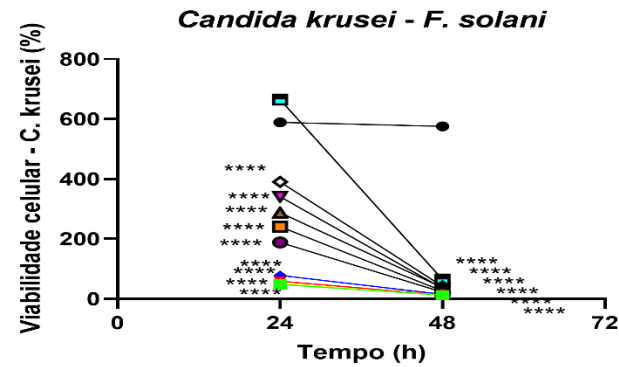


A-*Escherichia coli*; B- *Staphylococcus aureus*.

Figura 27. Atividade Antifúngica dos metabólitos secundários de *F. oxysporum* e *Fusarium solani* em cepas de *C. albicans* e *C. krusei*.



C



D

C- *Candida albicans*; D- *Candida krusei*

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi identificado morfologicamente um isolado de *Fusarium solani* que foi confirmado por PCR utilizamos primers específicos da região ITS. As espécies de *Fusarium* são difíceis de identificar por serem semelhantes sendo importante utilizar métodos moleculares para diferenciar os táxons (MAHMOUD; SHEHATA, 2017). Os dois metabólitos avaliados mostraram propriedades antioxidantes. Estes resultados sugerem que os metabólitos analisados podem ter compostos com potencial para formulações farmacêuticas. De acordo Chowdhury e colaboradores (2017) os compostos com propriedades antioxidantes são capazes de inibir ou reduzir a reação de oxidação em cadeia. Também, corroboram com o estudo realizados por Khan et al., (2018) no qual verificou que o metabólito secundário *F. solani* teve propriedade antioxidante.

Os dois metabólitos avaliados exibiram a presença de compostos fenólicos, alcaloides e flavonoides, entretanto, o metabólito secundário de *Fusarium solani* apresentou maior reação para a presença de fenóis e média para alcaloide e a presença desses compostos influenciam nas atividades biológicas. Segundo Vuolo et al., (2019) os compostos fenólicos estão nas categorias de fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoicos e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, naftoquinonas, antraquinonas, biflavonoides, lignanas e de ligninas.

Dentre os compostos identificados na fração acetato de etila do metabólito secundário de *F. solani*, os compostos majoritários foram 9-Octadecenoic acid (Z)-methyl éster, Hexadecanoic acid methyl éster, 9-Octadecenamida, (Z)-Oleic acid amida e Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexadro-3-(phenylmethyl). E na fração diclorometano 9-Octadecenoic acid (Z)-methyl éster, N-Butylacetamide, Acetic acid, (p-hydroxyphenyl), Benzeneacetic acid, Acetic acid, phenyl - 4-(2-Hydroxyethyl) phenol, Acetamide, N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-, Hexadecanoic acid, methyl ester, (Palmitato de metila), 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (Oleato de Metila), Octadecanoic acid, methyl ester (Estearato de metila). Estudos realizados por Karkovi, Barbari (2019) e Rani et al., (2014) sugerem que estes compostos possuem alto potencial para diversas atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer.

Houve diferença nos efeitos citotóxicos entre os metabólitos testados, a concentração de 1000 µg/mL, os metabólitos de *Fusarium oxysporum* teve efeito proliferativo para MCF-7 e citotóxico para célula normal de próstata PNT.

Já o metabólito do *Fusarium solani*, a concentração 1000 µg/mL, foi citotóxico (mesmo não sendo significativo) para célula MCF-7 e não citotóxico para célula normal de próstata PNT. Em estudo realizado por Tadpetch et al (2015) com metabólito de *Fusarium solani*, foi verificado que o composto naftoquinona teve efeito citotóxico em célula MCF-7.

Houve variações em relação ao efeito antibacteriano e antifúngico nas maiores concentrações (32, 16, 8 µg/ml) entre as cepas testadas sugerindo, assim, que a densidade dos metabólitos influenciou na entrada do metabólito na célula, já que as menores concentrações variando de 0,625 a 8 µg/ml tiveram efeito inibitório.

O efeito do metabólito secundário de *Fusarium solani* ($p < 0,0001$) significativo para *E. coli* e *Candida albicans* em todas as concentrações testadas corroborando com o estudo realizado por Kyekyeku et al., (2017) onde foi avaliada atividade de compostos químicos obtidos do metabólito de *Fusarium solani* frente cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* e *Acinetobacter sp.*

Dados semelhantes também foram constados no estudo de Ibrahim et al (2016) no qual foi avaliada a atividade do metabólito secundário de *Fusarium chlamydosporium* contra cepas de *Candida albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. No presente trabalho consta-se que os metabólitos secundários das duas cepas em estudo apresentaram atividade biológicas semelhantes às apresentadas nas literaturas.

Portanto, acredita-se que os fungos em estudo apresentam potencial biotecnológico, uma vez que os metabólitos secundários brutos apresentaram algumas atividades biológicas. Sugere-se estudos mais aprofundados para comprovação da eficácia dos mesmos.

7. CONCLUSÃO

A identificação taxonômica e PCR do *Fusarium do ar* mostrou que a espécie isolada é *Fusarium solani*.

As classes químicas presentes nos metabólitos estudados são compostas com potencial importantes.

O Perfil cromatográfico revelou vários compostos citados na literatura como potencial terapêutico do câncer destacando-se os compostos 4-(2-Hydroxyethyl) phenol, L-Proline, N-valeryl, heptadecyl, Hexadecanoic acid methyl ester, 9-Octadecenoic acid (Z)-methyl éster.

Fusarium solani apresentou relativa atividade antitumoral em linhagens MCF-7.

Os metabólitos secundários apresentaram atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Rafael; NASCIMENTO, Beatriz; OLIVEIRA, Lins De; PINHEIRO, Luiza; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora; CHAVES, Gabriela Costa. Antimicrobial Resistance : formulation of the response in the global health context. **Saúde Debate**, [S. l.], v. 44, n. 126, p. 607–623, 2020. DOI: 10.1590/0103-1104202012602I. Disponível em: <https://www.who.int/>.
- ALVES, Daniela Ribeiro; SILVA, Wildson Max Barbosa Da; SANTOS, Dayanne Lima Dos; FREIRE, Francisco das Chagas de Oliveira; VASCONCELOS, Fábio Roger; MORAIS, Selene Maia De. Atividades Antioxidante, Anticolinesterasica E Citotóxica De Metabolitos De Fungos Endofiticos / Antioxidant, Anticolinesterasic and Cytotoxic Activities of Endophytic Fungus Metabolites. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 73684–73691, 2020. ISSN: 25258761. DOI: 10.34117/bjdv6n9-721.
- BIOTECHNOL, Biol et al. Growing a circular economy with fungal biotechnology : a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, [S. l.], p. 1–23, 2020. ISSN: 2054-3085. DOI: 10.1186/s40694-020-00095-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z>.
- BRANKOVICS, Balázs; KULIK, Tomasz; SAWICKI, Jakub; BILSKA, Katarzyna; ZHANG, Hao; DE HOOG, G. Sybren; VAN DER LEE, Theo A. J.; WAALWIJK, Cees; VAN DIEPENINGEN, Anne D. First steps towards mitochondrial pan-genomics: Detailed analysis of *Fusarium graminearum* mitogenomes. **PeerJ**, [S. l.], v. 2018, n. 12, p. 1–21, 2018. ISSN: 21678359. DOI: 10.7717/peerj.5963.
- BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; FRIES, Bettina C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1–19, 2020. ISSN: 20796382. DOI: 10.3390/antibiotics9060312.
- BILLS, GERALD F.; GLOER, JAMES B. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 1–32, 2016. ISSN: 07349750. DOI: 10.1016/0734-9750(93)90042-L.
- BORUTA, Tomasz; BIZUKOJC, Marcin. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus* : a comparative perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 1–12, 2017. ISSN: 1573-0972. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1007/s11274-017-2206-9.
- BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. ISSN: 1542-4863. DOI: 10.3322/caac.21492.

ČERNÁKOVÁ L, Light C; SALEHI B, ROGEL-CASTILLO, C, Victoriano M.; MARTORELL M.; SHARIFI-RAD J, Martins N.; RODRIGUES CF. Novel Therapies for Biofilm-Based *Candida* spp. Infections. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1214:93-123. doi: 10.1007/5584_2019_400. PMID: 31321751.

NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 26 (2015).

CHENG, Wen-ming; ZHANG, Qun-lin; WU, Ze-hua; ZHANG, Zhi-yong; MIAO, Yi-ru; PENG, Fan; LI, Chun-ru. Identification and determination of myriocin in *Isaria cicadae* and its allies by. **Mycology**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 286–292, 2017. ISSN: 2150-1203. DOI: 10.1080/21501203.2017.1383319. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1383319>.

CHOWDHURY, Nargis Sultana; SOHRAB, Md Hossain; RANA, Md Sohel; HASAN, Choudhury Mahmood; JAMSHIDI, Shirin; RAHMAN, Khondaker Miraz. Cytotoxic Naphthoquinone and Azaanthraquinone Derivatives from an Endophytic *Fusarium solani*. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 1173–1177, 2017. ISSN: 15206025. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00610.

COSTA, Treicikelly Suguimoto; CARDOSO, Alessandra Marques. *Escherichia coli* em uroculturas de pacientes comunitários: prevalência e perfil de suscetibilidade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S. l.], v. 52, n. 1, 2020. ISSN: 2448-3877. DOI: 10.21877/2448-3877.202000868.

DADAR, Maryam; TIWARI, Ruchi; KARTHIK, Kumaragurubaran; CHAKRABORTY, Sandip; SHAHALI, Youcef; DHAMA, Kuldeep. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 117, n. December 2017, p. 128–138, 2018. ISSN: 10961208. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>.

DESHMUKH, Radhika; MATHEW, Anoop; PUROHIT, Hemant J. Characterization of antibacterial activity of bikaverin from *Fusarium* sp. HKF15. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 117, n. 4, p. 443–448, 2014. ISSN: 13474421. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.017>.

DERBYSHIRE, Emma J.; DELANGE, Joanne. Fungal Protein – What Is It and What Is the Health Evidence ? A Systematic Review Focusing on Mycoprotein. [S. l.], v. 5, n. February, 2021. DOI: 10.3389/fsufs.2021.581682.

DI COLOGNA, N. Mojana. Análise comparativa de complexos multienzimáticos do secretoma de *Trichoderma harzianum* cultivado em bagaço de cana e fontes definidas de carbono. [S. l.], p. 2017, 2017. Disponível em:

<http://repositorio.unb.br/handle/10482/23715>.

FRASER, Mark; BROWN, Zoe; HOULDSWORTH, Marian; BORMAN, Andrew M.; JOHNSON, Elizabeth M. Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 80–88, 2016. ISSN: 14602709. DOI: 10.1093/mmy/myv085.

GÓMEZ-VELÁSQUEZ, Juan C.; LOAIZA-DÍAZ, Natalia; HERNÁNDEZ, Gilma Norela; LIMA, Nelson; MESA-ARANGO, Ana C. Development and validation of an in-house library for filamentous fungi identification by maldi-tof ms in a clinical laboratory in medellin (Colombia). **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 1–13, 2020. ISSN: 20762607. DOI: 10.3390/microorganisms8091362.

GONÇALVES, Brisa; BASTOS, Eduardo; HANNA, Samira. Prospecção Tecnológica De Fungos Endófitos E Aplicações Na Indústria Farmacêutica. **Cadernos de Prospecção**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 56, 2017. ISSN: 1983-1358. DOI: 10.9771/cp.v10i1.20114.

GOW, Neil A. R.; LATGE, Jean-Paul; MUNRO, Carol A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **The Fungal Kingdom**, [S. l.], n. May, p. 267–292, 2017. ISBN: 9781683670827. DOI: 10.1128/9781555819583.ch12.

GRECO, Claudio; KELLER, Nancy P.; ROKAS, Antonis. Unearthing fungal chemodiversity and prospects for drug discovery. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 51, p. 22–29, 2019. ISSN: 18790364. DOI: 10.1016/j.mib.2019.03.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.03.002>.

GUO, Zongru. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017. ISSN: 22113843. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.06.003.

HANZELMANN, Dennis et al. Toll-like receptor 2 activation depends on lipopeptide shedding by bacterial surfactants. **Nature Communications**, [S. l.], v. 7, 2016. ISSN: 20411723. DOI: 10.1038/ncomms12304.

HASIM, Sahar; COLEMAN, Jeffrey J. Targeting the fungal cell wall: Current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. **Future Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 869–883, 2019. ISSN: 17568927. DOI: 10.4155/fmc-2018-0465.

HYDE, Kevin D. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 1–136, 2019. ISSN: 18789129. DOI: 10.1007/s13225-019-00430-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>.

IBRAHIM, Sabrin R. M.; MOHAMED, Gamal A.; AL HAIDARI, Rwaida A.; ZAYED, Mohamed F.; EL-KHOLY, Amal A.; ELKHAYAT, Ehab S.; ROSS, Samir A. Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 786–790, 2018. ISSN: 14643391. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.12.049. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.049>.

IBRAHIM, Sabrin Ragab Mohamed; ELKHAYAT, Ehab Saad; MOHAMED, Gamal Abd Allah; FAT'HI, Shaukat Mohammed; ROSS, Samir Anis. Fusarithioamide A, a new antimicrobial and cytotoxic benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 479, n. 2, p. 211–216, 2016. ISSN: 10902104. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.041. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.041>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019.

JAMIU, A. T.; ALBERTYN, J.; SEBOLAI, O. M.; POHL, C. H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 14–30, 2021. ISSN: 14602709. DOI: 10.1093/mmy/myaa031.
KARKOVI, Ana; BARBARI, Monika. Potential Effects on Human Health. [S. l.], 2019.

JEVONS MP. "Celbenin" - resistant Staphylococci. *Br Med J*. 1961 Jan 14;1(5219):124–5. PMID: PMC1952888.

KASAEI, Abdollah; MOBINI-DEHKORDI, Mohsen; MAHJOUBI, Foruzandeh; SAFFAR, Behnaz. Isolation of Taxol-Producing Endophytic Fungi from Iranian Yew Through Novel Molecular Approach and Their Effects on Human Breast Cancer Cell Line. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 74, n. 6, p. 702–709, 2017. ISSN: 14320991. DOI: 10.1007/s00284-017-1231-0.

KIM CK; MILHEIRIÇO C, de Lencastre H; TOMASZ A. Antibiotic Resistance as a Stress Response: Recovery of High-Level Oxacillin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* "Auxiliary" (*fem*) Mutants by Induction of the Stringent Stress Response. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jul 25;61(8):e00313-17. doi: 10.1128/AAC.00313-17. PMID: 28630179; PMID: PMC5527599.

KHAN, Nasima; AFROZ, Farhana; BEGUM, Mst Nadira; ROY RONY, Satyajit; SHARMIN, Suriya; MONI, Fatema; MAHMOOD HASAN, Choudhury; SHAHA, Koushik; SOHRAB, Md Hossain. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 5, n. September, p. 970–976, 2018. ISSN: 22147500. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.08.016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.016>.

KÜES, Ursula. Fungal enzymes for environmental management. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 33, p. 268–278, 2015. ISSN: 18790429. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.03.006.

KUMAR, Hemant; LIM, Hyung Woo; MORE, Sandeep Vasant; KIM, Byung Wook; KOPPULA, Sushruta; KIM, In Su; CHOI, Dong Kug. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: Convergence and parallelism. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 10478–10504, 2012. ISSN: 14220067. DOI: 10.3390/ijms130810478.

KYEKYEKU, James Oppong; KUSARI, Souvik; ADOSRAKU, Reimmel Kwame; BULLACH, Anke; GOLZ, Christopher; STROHMANN, Carsten; SPITELLER, Michael. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Fusarium solani* JK10. **Fitoterapia**, [S. l.], v. 119, n. February, p. 108–114, 2017. ISSN: 18736971. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.04.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2017.04.007>.

LEE, Hyunjung; WON, Sung; HWA, Chang; JIN, Young; YOUL, Tae. Biochemical and Biophysical Research Communications in pancreatic β -cell through JNK signaling. **Biochemical and Biophysical Research**

LI, Mingzhu.; YU., Ronglu; BAI, Xuelian; WANG, Hong; ZHANF, Huawei. *Fusarium*: a treasure trove of bioactive secondary metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 2020, 37, 1568–1588. This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

LOHSE, Matthew B.; GULATI, Megha; JOHNSON, Alexander D.; NOBILE, Clarissa J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018. ISSN: 17401534. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.107. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>.

MAENG, Hoyoung M.; BERZOFSKY, Jay A. Strategies for developing and optimizing cancer vaccines. **F1000Research**, [S. l.], v. 8, n. May, p. 1–14, 2019. ISSN: 1759796X. DOI: 10.12688/f1000research.18693.1.

MALANOVIC, Nermina; LOHNER, Karl. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [S. l.], v. 1858, n. 5, p. 936–946, 2016. ISSN: 18792642. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.11.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>.

MARQUEZ, Marisol; BARRERA, Guadalupe; DÍAS, Jhoana. **Mecanismo de patogenicidad de Escherichia Coli y Salmonella SSP**. *Revista de Educación en Ciencias* 2019.

MEGHAVARNAM, Anil K.; SALAH, Maryam; SREEPRIYA, Meenakshisundaram; JANAKIRAMAN, Savitha. Growth inhibitory and proapoptotic effects of l-asparaginase from *Fusarium culmorum* ASP-87 on human leukemia cells (Jurkat). **Fundamental and Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 292–300, 2017. ISSN: 14728206. DOI: 10.1111/fcp.12257.

MOHAMED, Hala F. Molecular analysis and anticancer properties of two identified isolates, *Fusarium solani* and *Emericella nidulans* isolated from Wady El-Natron soil in Egypt against Caco-2 (ATCC) cell line. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 863–869, 2012. ISSN: 22211691. ISBN: 0020127170622. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60244-5.

MAHMOUD, Mohamed A.; SHEHATA, Shereen M. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with wheat grains. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* (2017). 4(4): 77-87

MOSUNOVA, Olga; NAVARRO-MUÑOZ, Jorge C.; COLLEMARE, Jérôme. The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. **Reference Module in Life Sciences**, [S. l.], p. 1–19, 2020. ISBN: 9780128096338. DOI: 10.1016/b978-0-12-809633-8.21072-8.

PAJERSKI, Wojciech; OCHONSKA, Dorota; BRZYCHCZY-WLOCH, Monika; INDYKA, Paulina; JAROSZ, Magdalena; GOLDA-CEPA, Monika; SOJKA, Zbigniew; KOTARBA, Andrzej. Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 21, n. 8, 2019. ISSN: 1572896X. DOI: 10.1007/s11051-019-4617-z.

PALUMBO, Michael O. et al. Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 4 MAY, n. May, p. 1–9, 2013. ISSN: 16639812. ISBN: 1663-9812. DOI: 10.3389/fphar.2013.00057.

PATEL, Robin. A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2019. ISSN: 2309608X. ISBN: 1507538057. DOI: 10.3390/jof5010004.

PATHAK, Ayush; NOWELL, Reuben W.; WILSON, Christopher G.; RYAN, Matthew J.; BARRACLOUGH, Timothy G. Comparative genomics of Alexander Fleming's original *Penicillium* isolate (IMI 15378) reveals sequence divergence of penicillin synthesis genes. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. ISSN: 20452322. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1038/s41598-020-72584-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72584-5>.

PEIXOTO, Ana Paula. Imunoterapia profilática com células dendríticas reduz metástases pulmonares em modelo de câncer de mama experimental Prophylactic immunotherapy with dendritic cells reduces lung metastases in an experimental breast cancer model. *[S. l.]*, p. 47401–47414, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n5-241.

PEREIRA, Eric; SANTOS, Ana; REIS, Francisca; TAVARES, Rui M.; BAPTISTA, Paula; LINO-NETO, Teresa; ALMEIDA-AGUIAR, Cristina. A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. **Microbiological Research**, *[S. l.]*, v. 168, n. 1, p. 1–5, 2013. ISSN: 09445013. ISBN: 0944-5013. DOI: 10.1016/j.micres.2012.06.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.008>.

PERLIN, David S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, *[S. l.]*, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017. ISSN: 14744457. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.

PORRAS-ALFARO, Andrea; LIU, Kuan Liang; KUSKE, Cheryl R.; XIEC, Gary. From genus to phylum: Large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. **Applied and Environmental Microbiology**, *[S. l.]*, v. 80, n. 3, p. 829–840, 2014. ISSN: 00992240. DOI: 10.1128/AEM.02894-13.

RAN, Xueqin; ZHANG, Gen; LI, Sheng; WANG, Jiafu. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*. **African Health Sciences**, *[S. l.]*, v. 17, n. 2, p. 566–574, 2017. ISSN: 16806905. DOI: 10.4314/ahs.v17i2.34.

RANI, Priyanka; PAL, Dilipkumar; HEGDE, Rahul Rama; HASHIM, Syed Riaz. Anticancer, anti-inflammatory, and analgesic activities of synthesized 2-(substituted phenoxy) acetamide derivatives. **BioMed Research International**, *[S. l.]*, v. 2014, 2014. ISSN: 23146141. DOI: 10.1155/2014/386473.

RATNAWEERA, Pamoda B.; DE SILVA, E. Dilip; WILLIAMS, David E.; ANDERSEN, Raymond J. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, *[S. l.]*, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015. ISSN: 14726882. DOI: 10.1186/s12906-015-0722-4.

ROCHA, Wilma Raianny Vieira Da; NUNES, Luanne Eugênia; NEVES, Marina Luizy Rocha; XIMENES, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo; ALBUQUERQUE, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, *[S. l.]*, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021. ISSN: 2525-3409. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.14283.

ROMANS-FUERTE, Patricia; SONDERGAARD, Teis Esben; SANDMANN, Manuela Ilse Helga; WOLLENBERG, Rasmus Dam; NIELSEN, Kristian Fog; HANSEN, Frederik T.; GIESE, Henriette; BRODERSEN, Ditlev Egeskov; SØRENSEN, Jens Laurids. Identification of the non-ribosomal peptide synthetase responsible for biosynthesis of the potential anti-cancer drug sansalvamide in *Fusarium solani*. **Current Genetics**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 799–807, 2016. ISSN: 14320983. DOI: 10.1007/s00294-016-0584-4.

SALEHI, Behzad; BAYAT, Mansour; DEZFULIAN, Mehrouz; SABOKBAR, Azar; TABARAIE, Bahman. The assessment of anti-tumoral activity of polysaccharide extracted from terrestrial filamentous fungus. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1236–1241, 2018. ISSN: 1319562X. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.06.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.06.002>.

SANTOS, Cledir R.; FRANCISCO, Elaine; MAZZA, Mariana; PADOVAN, Ana Carolina B.; COLOMBO, Arnaldo; LIMA, Nelson. Impact of MALDI-TOF MS in Clinical Mycology; Progress and Barriers in Diagnostics. **MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology**, [S. l.], n. 1965, p. 211–230, 2016. ISBN: 9781118960226. DOI: 10.1002/9781118960226.ch9.

SANTOS, J. I.; VIEIRA, A. J. H. Brazilian Journal of Clinical Analyses. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 235–239, 2017. ISSN: 2448-3877.

SCHOCH, Conrad L. et al. Finding needles in haystacks: Linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. **Database**, [S. l.], v. 2014, p. 1–21, 2014. ISSN: 17580463. DOI: 10.1093/database/bau061.

SERVIN, Alain L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 823–869, 2014. ISSN: 10986618. DOI: 10.1128/CMR.00036-14.

SIBERO, Mada Triandala; ZHOU, Tao; FUKAYA, Keisuke; URABE, Daisuke; KARNA RADJASA, Ocky K.; SABDONO, Agus; TRIANTO, Agus; IGARASHI, Yasuhiro. Two new aromatic polyketides from a sponge-derived *Fusarium*.

SILVA, C. J.; MALTA, D. J. do N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 49–66, 2016.

SILVA, Sónia; RODRIGUES, Célia F.; ARAÚJO, Daniela; RODRIGUES, Maria Elisa; HENRIQUES, Mariana. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 3, n. 1, 2017. ISSN: 2309608X. DOI: 10.3390/jof3010008.

SINGHAL, Neelja; KUMAR, Manish; KANAUIA, Pawan K.; VIRDI, Jugsharan S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. AUG, p. 1–16, 2015. ISSN: 1664302X. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791.

STROBEL, Gary. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2018. ISSN: 2309608X. DOI: 10.3390/jof4020057.

SUMMERELL, Brett A. Resolving Fusarium : Current Status of the Genus. **Review in Advance**, [S. l.], v. 12, p. 1–17, 2019.

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. ISSN: 0007-9235. DOI: 10.3322/caac.21660.

SUN, Ming Shuo; JIN, Hang; SUN, Xin; HUANG, Shuo; ZHANG, Fu Liang; GUO, Zhen Ni; YANG, Yi. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2018, 2018. ISSN: 19420994. DOI: 10.1155/2018/3804979.

TAKAHASHI, Jacqueline A.; LIMA, Gesiane da S.; SANTOS, Gabriel F. Dos; LYRA, Fernanda H.; SILVA-HUGHES, Alice F. Da; GONÇALVES, Flávia A. G. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual da Química**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 2351–2382, 2017. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br>.

TCHOUKOUA, Abdou; HASEGAWA, Ryosuke; HENDRACIPTA, Kurniawan Andreas; SATO, Satoru; KOSEKI, Takuya; SHIONO, Yoshihito. Structure elucidation of new fusarielins from Fusarium sp. and their antimicrobial activity. **Magnetic Resonance in Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 32–36, 2018. ISSN: 1097458X. DOI: 10.1002/mrc.4662.

TELES, Amanda Mara; EVERTON, Gustavo Oliveira; MOUCHREK, Adenilde Nascimento; TELLIS, Carla Junqueira Moragas; BEZERRA, Geusa Felipa de Barros; SOUZA, Fernando Almeida De; SANTOS, Ana Paula Silva de Azevedo; NASCIMENTO, Maria do Desterro Soares Brandão. Triagem fitoquímica de extrato obtido do fungo *Penicillium purpurogenum* advindo de ambiente marinho poluído do Maranhão. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 8, 2020. ISSN: 2525-3409. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.6109.

TOGHUEO, Rufin Marie Kouipou. Bioprospecting endophytic fungi from Fusarium genus as sources of bioactive metabolites. **Mycology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–21, 2020. ISSN: 21501211. DOI: 10.1080/21501203.2019.1645053.

TORRE, Lindsey A.; BRAY, Freddie; SIEGEL, Rebecca L.; FERLAY, Jacques;

LORTET-TIEULENT, Joannie; JEMAL, Ahmedin. Global Cancer Statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin.**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015. ISSN: 1542-4863 (Electronic). ISBN: 00079235. DOI: 10.3322/caac.21262.

TSCHERNER, Michael; SCHWARZMÜLLER, Tobias; KUCHLER, Karl. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 169–186, 2011. ISSN: 14248247. DOI: 10.3390/ph4010169.

VALENZUELA-LOPEZ, Nicomedes; CANO-LIRA, José F.; STCHIGEL, Alberto M.; GUARRO, Josep. DNA sequencing to clarify the taxonomical conundrum of the clinical coelomycetes. **Mycoses**, [S. l.], v. 61, n. 10, p. 708–717, 2018. ISSN: 14390507. DOI: 10.1111/myc.12785.

VERMA, Shiv K. R.; LAL, Moti; DEBNATH DAS, Mira. Structural elucidation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 395–400, 2017. ISSN: 24553891. DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18909.

VILLANI, Alessandra; PROCTOR, Robert H.; KIM, Hye Seon; BROWN, Daren W.; LOGRIECO, Antonio F.; AMATULLI, Maria Teresa; MORETTI, Antonio; SUSCA, Antonia. Variation in secondary metabolite production potential in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex revealed by comparative analysis of 13 genomes. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–22, 2019. ISSN: 14712164. DOI: 10.1186/s12864-019-5567-7.

VUOLO, Milena Morandi; LIMA, Verena Silva; ROBERTO, Mário; JUNIOR, Maróstica. **Classification , and Antioxidant Power**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. ISBN: 9780128147740. DOI: 10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>.

WALKER, Clair; MACIEL, Caciara Gonzatto; MILANESI, Paola Mendes; MUNIZ, Marlove Fátima Brião; MEZZOMO, Ricardo; POLLET, Camila Schultz. Morphological, molecular and patogenicity characterization of *fusarium acuminatum* and *fusarium verticillioides* to *cordia americana* seeds. **Ciencia Florestal**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 463–473, 2016. ISSN: 19805098. DOI: 10.5902/1980509822747.

WALL, Gina; MONTELONGO-JAUREGUI, Daniel; VIDAL BONIFACIO, Bruna; LOPEZ-RIBOT, Jose L.; UPPULURI, Priya. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 52, p. 1–6, 2019. ISSN: 18790364. DOI: 10.1016/j.mib.2019.04.001.

WICKES, Brian L.; WIEDERHOLD, Nathan P. Molecular diagnostics in medical mycology. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2018. ISSN: 20411723. DOI: 10.1038/s41467-018-07556-5.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Director-General calls for all countries to take action to help end the suffering caused by cervical cancer. WHO; 2018. Acessado em 07 de junho de 2020.

WRIGHT, Gerard D. Q & A : Antibiotic resistance : where does it come from and what can we do about it ? **Jornal of Biology**, [S. l.], v. 8, p. 1741–7007, 2010.

WU, Qinghua; PATOCKA, Jiri; NEPOVIMOVA, Eugenie; KUČA, Kamil. A review on the synthesis and a review on the synthesis and bioactivity aspects of beauvericin, a Fusarium mycotoxin. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. NOV, p. 1–12, 2018. ISSN: 16639812. DOI: 10.3389/fphar.2018.01338.