



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO
MESTRADO ACADÊMICO



Curvularia lunata*: identificação molecular e efeito antimicrobiano *in vitro

NÍVIA RHENNYA DO NASCIMENTO SOARES

SÃO LUÍS

2022

NÍVIA RHENNYA DO NASCIMENTO SOARES

Curvularia lunata: identificação molecular e efeito antimicrobiano in vitro

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

Área de Concentração: Processos biológicos em saúde

Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas e endêmicas no Maranhão

Orientadora: Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra

Coorientadora: Profa. Dra. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall'Agnol

Coordenador: Marcelo Souza de Andrade

SÃO LUÍS

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

do Nascimento Soares, Nivia Rhennya.

Curvularia lunata: identificação molecular e efeito antimicrobiano in vitro / Nivia Rhennya do Nascimento Soares. - 2022.

48 p.

Coorientador(a): Hivana Patrícia Melo Barbosa Dallagnol.

Orientador(a): Geusa Felipa de Barros Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Antimicrobiano. 2. Curvularia lunata. 3. Extrato. 4. Identificação molecular. I. de Barros Bezerra, Geusa Felipa. II. Melo Barbosa Dallagnol, Hivana Patrícia. III. Título.

NÍVIA RHENNYA DO NASCIMENTO SOARES

Curvularia lunata*: identificação molecular e efeito antimicrobiano *in vitro

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

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou a candidata aprovada em: 16/09/2022.

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

Profa. Dra. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall'Agnol (Coorientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

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

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall'Agnol (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

Dedico a Deus, minha fortaleza, por guiar e iluminar meus caminhos e me amparar nos momentos difíceis.

A minha mãe pelo amor e dedicação ao longo desta caminhada.

A minha família e amigos que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e entendimento durante todo o processo, pelos obstáculos superados e vitórias alcançadas.

Agradeço especialmente a minha querida mãe, Jesus, pelo amor, carinho, suporte e palavras encorajadoras nos momentos difíceis.

Agradeço a minha segunda mãe, Neide, pelo apoio, orações e pela torcida para eu alcançar meus objetivos.

À toda minha família pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora pela amizade e confiança em me orientar, pelo acompanhamento e incentivo em todo o desenvolvimento do trabalho.

À minha coorientadora pela confiança, suporte e contribuições que enriquecem o trabalho.

Ao meu irmão e amigo, Regis, pelo incentivo, colaboração e amizade.

À minhas amigas Jéssica Furtado e Jéssica Kelly pela torcida, sempre.

Ao Dr. Lídio pela disponibilidade do laboratório LACEN/MA para a realização de experimentos.

Ao laboratório NIBA e equipe, pelo suporte, estrutura, conhecimentos compartilhados e convívio.

Ao laboratório LabGem e equipe pelo espaço cedido e apoio prestado.

A CAPES e PROCAD AMAZONIA pelo auxílio no financiamento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto - PPGSAD da Universidade Federal do Maranhão.

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece”
(Filipenses 4:13)

RESUMO

O fungo *Curvularia* sp. apresenta cerca de 119 espécies e possui como principal característica a variabilidade morfológica. As espécies deste gênero são classificadas como organismos saprófitos, endófitos e agentes patogênicos oportunistas, provocando nos seres humanos sinusite alérgica, pneumonia, endocardite, micetoma, onicomicose, queratites, abscessos cerebrais entre outros. Dentre as espécies de maior interesse, *C. lunata* é a principal isolada nos sítios de infecções humanas e de outros seres vivos. Além disso, a dificuldade da identificação é o principal desafio, pois há limitações dos recursos convencionais de identificação, fazendo necessária a utilização de técnicas mais sofisticadas. Outra abordagem importante é a utilização de metabólitos secundários produzidos pelos fungos como fonte alternativa na atividade antimicrobiana. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar molecularmente o isolado de *Curvularia* sp. e avaliar o seu extrato no perfil de toxicidade e antimicrobiano. Para isso foi realizada a extração de DNA do fungo isolado do ambiente, sendo aplicada a técnica da reação em cadeia da polimerase; produção do extrato e ensaios de toxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos, *in vivo* em modelo alternativo utilizando larvas de *Tenebrio molitor*, e para o perfil antimicrobiano foi testar o efeito do extrato em três cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, avaliando a concentração inibitória mínima, concentração bactericida e fungicida mínima, além do efeito anti-biofilme em superfície abiótica. Os resultados obtidos confirmaram através da caracterização molecular o isolado ambiental pertencente à espécie *C. lunata*; O extrato apresentou-se atóxico em ensaios de toxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos, *in vivo* em modelo alternativo utilizando larvas de *Tenebrio molitor*, foram observadas amplas atividades antimicrobianas nos três microrganismos testados e reduções na biomassa do biofilme. Portanto, concluímos neste estudo que as técnicas moleculares são ferramentas importantes para a identificação de espécies e que o extrato produzido a partir dos metabólitos secundários de *C. lunata* apresenta potencial promissor para futuras aplicações terapêuticas nas infecções de etiologia bacteriana e fúngica.

Palavras-chave: *Curvularia lunata*, Identificação molecular, Extrato, Antimicrobiano.

ABSTRACT

The fungus *Curvularia* sp. presents about 119 species and has morphological variability as its main characteristic. The species of this genus are classified as saprophytic organisms, endophytes and opportunistic pathogens, causing allergic sinusitis, pneumonia, endocarditis, mycetoma, onychomycosis, keratitis, brain abscesses, among others. Among the species of greatest interest, *C. lunata* is the main one isolated at sites of human and other living beings infections. In addition, the difficulty of identification is the main challenge, as there are limitations of conventional identification resources, making it necessary to use more sophisticated techniques. Another important approach is the use of secondary metabolites produced by fungi as an alternative source of antimicrobial activity. Thus, the aim of this study was to molecularly identify the *Curvularia* sp. and evaluate its extract on toxicity and antimicrobial profile. For this, the extraction of DNA from the fungus isolated from the environment was performed, using the polymerase chain reaction technique; extract production and toxicity tests in vitro using erythrocytes, in vivo in an alternative model using larvae of *Tenebrio molitor*, and for the antimicrobial profile it was tested the effect of the extract on three standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, evaluating the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal and fungicidal concentration, in addition to the anti-biofilm effect on abiotic surface. The results obtained confirmed, through molecular characterization, the environmental isolate belonging to the species *C. lunata*; The extract was non-toxic in in vitro toxicity assays using erythrocytes, in vivo in an alternative model using *Tenebrio molitor* larvae, broad antimicrobial activities were observed in the three microorganisms tested and significant reductions in biofilm biomass. Therefore, we conclude in this study that molecular techniques are important tools for species identification and that the extract produced from *C. lunata* secondary metabolites has promising potential for future therapeutic applications in bacterial and fungal infections.

Key-words: *Curvularia lunata*, Molecular identification, Extract, Antimicrobial.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Descrição do desenho dos primers para identificação molecular de <i>C. lunata</i>	23
Tabela 2. Ciclagens da PCR	23
Tabela 3. Descrição dos grupos experimentais do ensaio da toxicidade aguda em larvas de <i>T. molitor</i>	27
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) - µg/mL	34
Tabela 5. Descrição das concentrações (µg/mL) do tratamento do biofilme em formação	35

LISTA DE FÍGURAS

Figura 1. Características macro e microscópicas de <i>C. lunata</i>	19
Figura 2. Sequência da adição das amostras no gel de agarose	24
Figura 3. Esquema ilustrativo do preparo do extrato de <i>C. lunata</i>	25
Figura 4. Esquema ilustrativo do ensaio da toxicidade aguda em larvas de <i>T. molitor</i>	27
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação com iniciadores específicos para <i>Curvularia</i> sp e <i>C. lunata</i>	31
Figura 6. Avaliação de toxicidade do Extrato de <i>C. lunata</i> (ECL) em eritrócitos de carneiro	32
Figura 7. Avaliação da toxicidade do extrato de <i>C. lunata</i> (ECL) em larvas de <i>T. molitor</i>	33
Figura 8. Efeito do ECL e drogas padrão na biomassa do biofilme	36
Figura 9. Número de unidades formadoras de colônias (UFC's) por biofilme microbiano	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

AMH - Ágar Muller Hinton

ATCC - American Type Culture Collection (Coleção de Cultura Americana)

CBM - Concentração bactericida mínima

CFM - Concentração Fungicida mínima

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CV - Cristal Violeta

DO - Densidade Óptica

ECL - Extrato de *Curvularia lunata*

DNA - Ácido desoxiribunocléico

DNAr - Ácido desoxiribunocléico ribossomal

dATP - Deoxi-adenosina trifosfato

dCTP - Deoxi-citosina trifosfato

dGTP - Deoxi-guanidina trifosfato

dNTP - Deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

GenBank - Banco de dados de Nucleotídeos do NLM/NCBI, localizado no National Institutes of Health (NIH)

IA01 – Isolado Ambiental 01

ITS - *Internal transcribed spacer* (região de transcrição interna)

NIBA - Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

RPMI - Instituto Memorial Roswell Park

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Taq - *Thermus aquaticus*

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

YNB - Base de Nitrogênio de Levedura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Fungos endofíticos	16
2.2 <i>Curvularia</i> sp.	17
3. OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 Obtenção do fungo <i>Curvularia</i> sp.	22
4.2 Extração do DNA	22
4.3 Desenho dos primers	23
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região ITS.....	23
4.5 Eletroforese	24
4.6 Preparo do extrato	25
4.7 Ensaio hemolítico	26
4.8 Ensaio da toxicidade aguda em larvas de <i>T. molitor</i>	26
4.9 Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> do ECL	28
4.9.1 Microrganismos	28
4.9.2 Ensaio turbidométrico à base de resazurina para determinar a	28
concentração inibitória mínima (CIM).	
4.9.3 Ensaio da concentração bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínima...	29
4.9.4 Ensaio do biofilme em superfície abiótica	29
4.9.5 Ensaio das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) do biofilme	30
microbiano	
4.10 Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Identificação molecular de <i>Curvularia</i> sp.	31
5.2 O ECL apresenta efeito atóxico para eritrócitos	31
5.3 O ECL garante a sobrevivência das larvas de <i>T. molitor</i>	32
5.4 Efeito antimicrobiano do ECL em <i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i>	34

5.5 O ECL interfere na formação do biofilme microbiano	34
5.6 O ECL diminui as Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) do biofilme	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Curvularia* é composto por cerca de 119 espécies e apresenta uma variabilidade morfológica observada nas espécies pertencentes a esse gênero, sendo dividido em três grupos: “*geniculata*”, representado pela espécie *C. geniculata*, o grupo “*lunata*”, representado por *C. lunata* e o grupo “*maculans*”, com a espécie *C. maculans*, suas diferenças estão relacionadas de acordo com a sua morfologia, presença de conídios, números de septos e aspectos da colônia (WEBER, 2006; LIMA; FURTADO, 2007; MADRID et al., 2019).

As espécies desse gênero consistem em fungos saprófitos, endófitos e agentes patogênicos oportunistas, provocando nos seres humanos sinusite alérgica, pneumonia, endocardite, micetoma, onicomicose, queratites, abscessos cerebrais entre outros, sendo a *C. lunata* a principal espécie isolada nos sítios de infecção. Entretanto, para o desenvolvimento das infecções de origem fúngica existe uma variabilidade de fatores relacionados ao patógeno e aspectos do hospedeiro, relacionados com a integridade do sistema imune, que é a chave principal (LAKHUNDI et al., 2017).

Outro desafio relacionado à espécie é a dificuldade da identificação dos caracteres de *Curvularia*, devido à diversidade de espécies e limitações dos registros, principalmente em trabalhos mais antigos e das inconstâncias de características morfológicas e biométricas dos esporos causadas por diferentes condições em que ocorre o crescimento e, sobreposição dos valores das medidas apresentadas por diferentes autores (SUN et al., 2003; CAVANNA et al., 2014).

A aplicação de técnicas moleculares tem auxiliado significativamente na identificação de espécies de fungos, bem como em estudos filogenéticos e taxonômicos, incluindo a diferenciação de agrupamentos intraespécies (ALVES et al., 2020).

Curvularia demonstra promissoras atividades com potencial exploração, como agentes antimicrobianos que apresenta inibição de alguns microrganismos patogênicos, sendo a bactéria *E. coli* a mais suscetível a todos os extratos brutos. Metabólitos de *Curvularia* exibem atividade antifúngica contra os patógenos fúngicos como, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton* sp. (TAYUNG; SARKAR; BARUAH, 2012).

Os endofíticos, como o gênero *Curvularia*, ainda não foram amplamente explorados em relação a suas propriedades terapêuticas, um único microrganismo endófito pode ser capaz de produzir vários metabólitos bioativos, com fontes ricas de metabólitos quimicamente

diferentes e com vasta aplicação nas indústrias farmacêuticas e na agricultura (MEDEIROS et al. 2018).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são microrganismos que pertencem principalmente aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, classificados de acordo com o hospedeiro colonizado, o modo de colonização, tipo de transmissão e função ecológica. Esses organismos podem colonizar os tecidos vegetais por meio de estruturas presentes nas plantas como estômatos ou hidatódios, produzindo enzimas líticas capazes de degradar a parede vegetal ou por fissuras ocasionadas por fungos fitopatogênicos ou insetos (FRANCO et al, 2014).

A principal estrutura da planta em que a colonização pelos endófitos nos vegetais é a raiz, contudo, pode acontecer por meio das sementes do hospedeiro, quando o microrganismo endofítico se difunde de forma sistêmica entre as gerações da planta e pode se instalar durante todas as fases de vida da planta hospedeira (GALLON et al., 2015).

Os fungos endofíticos podem estar presentes em espécies vegetais das mais variadas regiões e de todas as categorias, sendo encontrados habitando briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas e podendo ser generalistas ou específicos do seu hospedeiro. Essa interação mutualística entre fungos e plantas sugere que os fungos coevoluíram com seus hospedeiros: os vegetais proporcionam nutrientes e proteção aos fungos ao passo que recebem compostos químicos como enzimas, alcaloides e antibióticos fazendo com que a planta tenha maior resistência em ambientes adversos cujo fator pode ser biótico (inseto, herbívoros, microrganismos) e/ou abiótico (pH, temperatura, estresse hídrico) (PAMPHILE et al., 2017).

Vale destacar que por meio desta interação, o endófito pode produzir as mesmas substâncias químicas da planta hospedeira, o que se considera uma transposição de genes entre as plantas e os fungos. Logo, o interesse da comunidade científica por produtos naturais oriundos de fungos endofíticos vem crescendo pelo fato de ser uma nova fonte de biomoléculas ativas de estrutura única e com grande atividade biológica, que desperta interesse na indústria farmacêutica, agrícola e na biotecnológica (LUNARDELLI *et al.*, 2016).

Entre as descobertas destaca-se o composto taxol, um diterpenóide produzido pela planta *Taxus brevifolia*, com atividade anticancerígena no tratamento de câncer mamário e

uterino, que também é produzido por um fungo endofítico, *Taxomyces andreanae*, isolado do vegetal (GONÇALVES et al., 2013).

Ademais, os fungos endofíticos são responsáveis pela produção de enzimas de interesse industrial, tais como: celulasas, xilanases, pectinases e amilases. Os fungos endofíticos no período de colonização do vegetal são capazes de degradar paredes celulares e facilitar sua entrada no hospedeiro por meio da produção de enzimas líticas (pectinases, celulasas e lipase) (LACAVA et al, 2014).

As enzimas também funcionam como um modo de resistência para o fungo para superar as defesas da planta durante a invasão microbiana e como uma forma dos fungos obterem alimentos para seu hospedeiro, além de serem necessárias para o crescimento e manutenção do organismo, como é o caso das proteases e das endonucleases (FILLAT et al., 2017).

Logo, conforme explanado, os fungos endofíticos são empregados para diversos fins e o entendimento das interações entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras podem abrir novas perspectivas para bioprospecção de moléculas biologicamente ativas e estudos de diversidade desses organismos promissores nas áreas agrícolas, médicas e farmacêuticas.

2.2 *Curvularia* sp.

O gênero *Curvularia* pertence à família Pleosporaceae, ordem Pleosporales e filo Ascomycota. Apesar de ser um grupo de fungos monofilético, as espécies podem ser encontradas divididas em: saprófitas, endofíticas e patogênicas em plantas, animais e mais recentemente, seres humanos (MARIN-FELIX et al. 2020). Espécies fitopatogênicas podem afetar gramíneas silvestres, culturas de arroz, café, milho, trigo, e causar grandes perdas na produção agrícola (TAN et al., 2018).

As espécies endofíticas têm despertado interesse nos últimos anos pela sua produção de metabólitos que são benéficos para os organismos vivos e ao meio ambiente. Desde o primeiro relato de *Curvularia* spp. como patógeno humano em paciente com micetoma, outras apresentações clínicas têm sido relatadas, principalmente atingindo o trato respiratório, mas podem até causar feohifomicose cerebral (BENGYELLA et al. 2019).

Entre as características morfológicas destacam-se conidióforos simpodiais com células conidiogênicas mono a politréticas e conídios septados transversalmente. Tipicamente, os conídios em *Curvularia* spp. podem apresentar curvatura devido à hipertrofia de células

intermediárias e são euseptados. Para alguns autores, os conídios do gênero são distoseptados (MADRI et al., 2014).

Algumas espécies presentes no gênero, anteriormente a outros dois gêneros *Bipolaris* spp. e *Exserohilum* spp. Contudo, a presença de algumas características morfológicas como conídios retos e distoseptados e com base em análises de sequência de DNA, foram responsáveis pela transferência de algumas espécies para o gênero *Curvularia* spp. (HERNÁNDEZ-RESTREPO et al. 2018). Além disso, devido à sobreposição de caracteres morfológicos entre certas espécies de *Curvularia*, como tamanho, forma e septação dos conídios, uma identificação precisa em nível de espécie é difícil sem uma análise da sequência de DNA (MANAMGODA et al., 2015).

Várias espécies foram descritas recentemente utilizando apenas análises de sequência multilocus dos códigos de barras de DNA recomendados para delimitação de espécies, ou seja, a região do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossomal (DNAr), o locus codificador de proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e fator de alongamento de tradução 1- α (TEF- 1) (TAN et al. 2018).

Dentre as características macroscópicas podem ser encontradas colônias com micélios de aspecto algodinoso, bordas regulares ou irregulares, coloração variando entre verde musgo ou cinza como descrito para a espécie por Kim e Lee (1998) (**Figura 1**).

C. lunata é relatada na maioria das vezes como um fitopatógeno, no entanto, já foram encontrados poucos casos de infecções fúngicas superficiais como Tinea nigra causadas pela espécie em um relato de caso ocorrido na China em uma paciente de três anos de idade (AL-ODAINI et al, 2022). Alguns estudos já relataram a espécie como um agente antimicrobiano promissor contra as espécies *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* quando sintetizadas com prata (RAMALINGMAM et al., 2015).

Ao se levar em consideração os altos custos econômicos e índices de mortalidade ocasionados por infecções sistêmicas fúngicas no ambiente hospitalar e na indústria tornou-se fundamental que haja rapidez, precisão e confiabilidade nos diagnósticos com o objetivo de se prescrever o tratamento mais adequado na tentativa de diminuir as altas taxas de mortalidade e os prejuízos industriais (RIVET-DAÑON et al., 2015).

O diagnóstico clínico baseado em sintomas isolados apresentados pelos pacientes não pode ser a única forma de identificação da causa da infecção, pois, são semelhantes aos apresentados por outras comorbidades e infecções causadas por bactérias e vírus (LAMOTH et al., 2018).

Com o aumento da incidência dessas comorbidades associadas a microrganismos houve também a necessidade de aprimoramento das técnicas de identificação desses patógenos. Atualmente, o diagnóstico micológico é realizado através de investigações em que se utilizam meios de cultura e cromogênicos, método de Gram, reação em cadeia da polimerase (PCR), cromatografia, sistemas automatizados e semiautomatizados. Ademais, sistemas automatizados e semiautomatizados, vêm sendo utilizados para facilitar e tornar mais rápido e preciso o diagnóstico (HASS; TORRES, 2016; ANDRADE et al., 2018; TORRES et al., 2022).

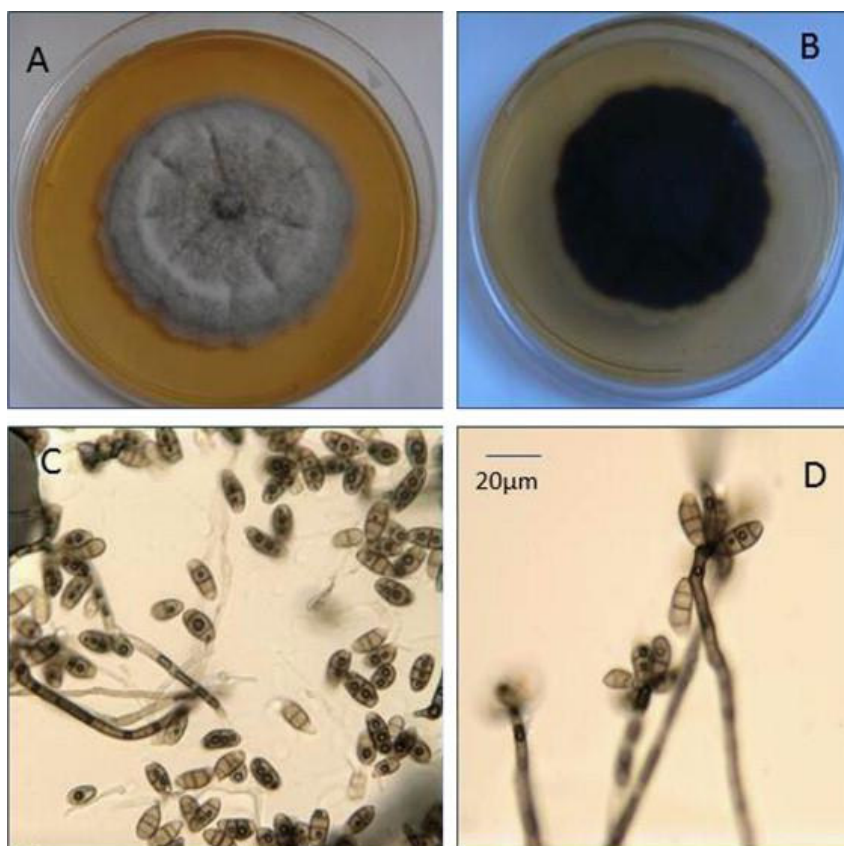


Figura 1. Características macro e microscópicas de *C. lunata*. Semeadura de culturas de *C. lunata* em ágar batata dextrose. (A) reverso da placa de Petri (B) após 7 dias de incubação a 30°C. (C) aparência microscópica típica de conídios de células múltiplas e germinação simpodial (D) após 5 dias de incubação a 30°C em ágar-água, mostrado por microscopia de contraste. Ampliação 20×. Fonte: Alex et al., (2013).

Para identificação e classificação de microrganismos patogênicos ainda são utilizados métodos da microbiologia clássica onde são visualizadas estruturas macro e microscópicas sendo o alvo da investigação características fenotípicas desses microrganismos (formato de células, produção de estruturas como hifas, pseudo hifas, tubos germinativos). O principal método de semeadura e crescimento dessas cepas se dá através do meio de cultura Agar Sabouraud onde é possível detectar diferenças no período de incubação dessas cepas, no

entanto, caso haja a presença de cepas mistas não ocorre essa detecção (AGARWAL et al, 2011).

Com isso, houve o desenvolvimento de meios cromogênicos, capazes de detectar a presença de cepas mistas devido aos substratos presentes no meio. Enzimas específicas de cada gênero e espécie reagem produzindo colorações diferentes, o que auxilia da identificação preventiva e na escolha do tratamento a ser estabelecido ao paciente (SCHARMANN et al, 2020).

Métodos de biologia molecular têm sido empregados na identificação de microrganismos devido à alta sensibilidade e especificidade, onde o genoma é analisado independente do estado fisiológico da célula e permitem a distinção de espécies relacionadas. Os genes-alvo para essas análises tem sido, citocromo 450, DNAríbssomal (DNAr), RNAríbssomal (RNAr), espaçadores de transcrição interna (ITS1, ITS2 e ITS4) (ARASTEHFAR et al, 2019). Essas moléculas, encontram-se em grande quantidade nas células leveduriformes sendo possível realizar sua amplificação e comparar os achados obtidos com os disponíveis em bancos de dados para efetivar a caracterização do microrganismo a ser estudado ou diagnosticado (WICKES; WIEDERHOLD, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar molecularmente o isolado de *Curvularia* sp. e avaliar o seu extrato no perfil de toxicidade e antimicrobiano.

3.2 Específicos

- Identificar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) qualitativa a espécie de *Curvularia* sp.;
- Obter o extrato de *C. lunata* (ECL);
- Avaliar o perfil de toxicidade do ECL *in vitro* em eritrócitos e *in vivo* em modelo alternativo invertebrado;
- Investigar o efeito antimicrobiano do ECL em espécies microbianas de *S. aureus*; *E. coli* e *C. albicans*;
- Analisar o efeito do ECL na formação do biofilme microbiano.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do fungo *Curvularia* sp.

O isolado de *Curvularia* sp. (IA01) foi obtida da coleção de fungos do Maranhão, depositada na micoteca do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão. Para a identificação molecular, foram aplicados os seguintes métodos.

4.2 Extração do DNA

Para este procedimento foi utilizado o protocolo descrito por Valenzuela-Lopez et al. (2017) com adaptações. O fungo foi cultivado em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Merck KGaA) e incubado a 25°C por 5 dias, após esse período, foram adicionados 100 mg do fungo em microtubo de 2 mL contendo 4 esférulas de vidro estéreis e após agitado em vórtex (Agitador Vórtex QL 901 – BIOMIXER) por 5 min, e em seguida incubado em banho-maria (Modelo 100 – FANEM LTDA®) a 65°C por 1 hora. Após, foi adicionado 500 µL de tampão de lise e novamente agitado por 40 seg, e centrifugado (5418 R – EPPENDORF SE) por 2 min a 13.000 rpm.

O sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo de 2 mL e após adicionado 275 µL de acetato de amônio (pH 7,0) e incubado por 5 min em banho-maria a 65°C. Após esse período, o tubo foi mantido em gelo por 5 min, em seguida adicionado 500 µL de fenol clorofórmio e centrifugado por 3 min a 13.000 rpm. Logo após, 600 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL e adicionado 1 mL de álcool isopropílico, sendo agitado por 5 min; o sobrenadante foi descartado e após adicionado 400 µL de etanol 70% e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm. Em sequência, o sobrenadante foi descartado por decantação sobre o papel de filtro. O *pellet* secou em temperatura ambiente, e após 24 h, o *pellet* foi ressuspensão em 50 µL de H₂O ultrapura e adicionado 2 µL de RNase A (Ludwig Biotecnologia), e após incubado por 20 min a 37°C. A amostra foi armazenada a -20°C até a próxima etapa.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas. A pureza e a concentração do DNA foram determinadas através do espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific™) foi utilizado a métrica de pureza da amostra pelo comprimento de onda 260 nm / 280 nm, os valores entre 1,4 e 2,0 nm é considerado puro e com a quantidade de DNA adequada.

4.3 Desenho dos primers

Os primers (*forward* e *reverse*) foram desenhados utilizando o *software* Primer3 versão 4.1.0 de acordo com sequências depositadas no GenBank e metodologia descrita por Singh e Kumar (2001). As informações obtidas no banco de dados foram específicas para amplificação de fragmentos do espaçador interno transcrito (ITS) do DNAríbssomal (DNAr) para do gênero *Curvularia* sp. descritas por White et al. (1990). Assim, as sequências dos primers aplicados nesse estudo para a identificação molecular do fungo para o gênero e espécie, estão descritas na **Tabela 1**.

DESENHO DOS PRIMERS			
Gene alvo		Sequência do primer	Tamanho do amplicon
Gênero	ITS1-5.8S-ITS2	5' CAT GTC TTT TGC GCA CTT GT 3' 5' GTC CGT TCA AAG ATT CGA TG 3'	226 pb
Espécie	Clg2p	5' AGG ATA ACG ATT ACT GTG TG 3' 5' ACA TGT TAG CCA ATG TAT TC 3'	215 pb

Tabela 1. Descrição do desenho dos primers para identificação molecular de *C. lunata*.

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região ITS

As reações de amplificações tiveram um volume final de 26,5 µL contendo 22,5 µL de Supermix (PCR SuperMix – INVITROGEN) 1,0 µL dos primers P1 e P2 (Invitrogen 10 pmol/mL-1), 2 µL DNA (620 ng/µL-1).

As reações foram conduzidas em termociclador (AMPLITHERM TX96) com o programa de amplificação a seguir, seguindo metodologia de Manamgoda et al. (2012) com modificações, visto na **Tabela 2**, e os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificar a amplificação.

Desnaturação	Ciclos	Extensão
95 °C/3 min	32 × (94 °C 30s / 52°C 1 min / 72°C 1 min)	72°C / 10 min

Tabela 2. Ciclagens da PCR.

4.5 Eletroforese

Em um Erlenmeyer foi adicionado 1,5g de agarose (Agarose LE – Ludwig Biotecnologia) dissolvido em 100 mL de TAE 1× e após fundido com aquecimento em micro-ondas por 1 min e 30 seg e aguardou-se o resfriamento da solução até atingir a temperatura em torno 40°C, após foi adicionado 5 µL de SYBR® Safe DNA gel Stain (INVITROGEN) e posteriormente homogeneizado de forma manual. O conteúdo foi transferido para a cuba de eletroforese contendo o pente denteado na parte superior para obtenção dos poços teste, e aguardou-se a polimerização do meio durante 20 min. A adição das amostras nos poços testes seguiu a seguinte ordem: 1° poço - 3 µL do marcador Ladder 100-1000 pb (Ludwig Biotecnologia) e 2 µL do corante BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10×) (INVITROGEN); 2° poço - ausente de amostra; 3° poço – 5 µL do produto da PCR1 e 2 µL do corante BlueJuice™; 4° poço – 5 µL do produto da PCR2 e 2 µL do corante BlueJuice™; 5° poço – Controle negativo (Supermix e primers), visto na **Figura 2**. As amostras foram submetidas à eletroforese a 100V/300A por 40 min. Para a revelação do resultado foi utilizado o transiluminador (LED K33-333- KASVI) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

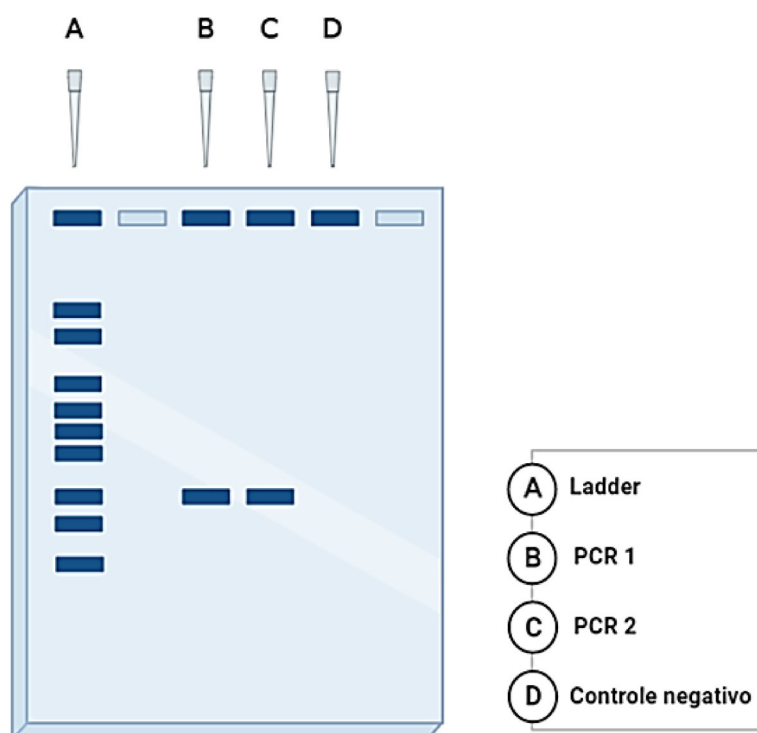


Figura 2. Sequência da adição das amostras no gel de agarose. Fonte: Autor

4.6 Preparo do extrato

A metodologia utilizada para este procedimento, foi descrita de acordo com Arivudainambi et al. (2011) com modificações (**Figura 3**). Para a obtenção do extrato, o fungo foi cultivado inicialmente em ASD e incubado a 25°C por 5 dias. Após o período de crescimento ótimo, foi retirado 6 fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro da cultura e transferidos para um Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de caldo Sabouraud e posteriormente incubado sem agitação a 25°C por 21 dias. Após o período de liberação dos metabolitos secundários do fungo no meio de cultivo, foi realizada a filtração (papel filtro Whatmann nº 1) para a separação da massa fúngica. O líquido resultante da filtração, foi transferido para o funil de separação (líquido/líquido), sendo adicionados 500 mL de Etanol PA e a extração perdurou por 24h. O produto resultante da partição foi submetido à rotaevaporação (temperatura inferior a 40°C). Em seguida, em um funil de separação, foram adicionados 200 mL de acetato de etila PA no líquido oriundo da rotaevaporação, e aguardou-se durante 24h. O líquido derivado foi submetido à rotaevaporação, liofilização (Liofilizador Liotop, K105, Brasil), por 48h, à -95°C e sob pressão de 12 µHg e posteriormente armazenado a 4°C para posteriores ensaios biológicos.

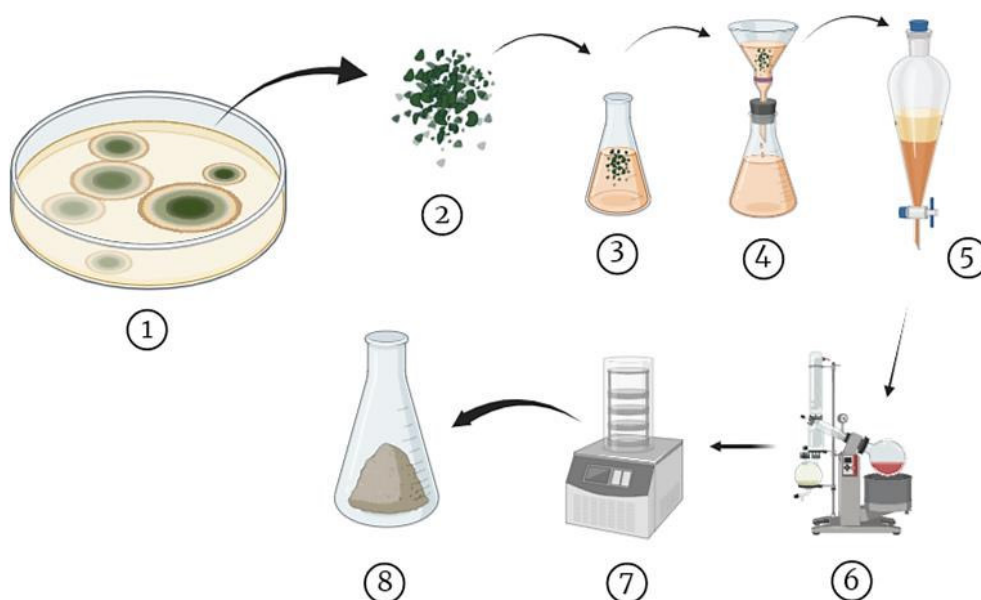


Figura 3. Esquema ilustrativo do preparo do extrato de *C. lunata*. (1) Fungo em cultura; (2) Fragmentos miceliais; (3) Cultivo em caldo; (4) Filtração; (5) Partição líquido/líquido; (6) Rotaevaporação; (7) Liofilização e (8) Extrato bruto. Fonte: Autor.

4.7 Ensaio hemolítico

Para este ensaio foi utilizado sangue de carneiro desfibrinado obtido de forma comercial (Laborclin Ltda, Pinhais, PR, BR). Os eritrócitos foram isolados por centrifugação a 1500 rpm por 10 min a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, os eritrócitos foram lavados três vezes com PBS (pH 7,4) e logo após, foram ressuspensos no mesmo tampão a 2% (v/v). Em seguida, a atividade hemolítica do ECL foi testada em condições *in vitro*, sendo adicionadas alíquotas de 100 µL da solução de eritrócitos em microplaca de 96 poços de fundo plano contendo 100 µL das diferentes concentrações do extrato variando entre 1000 a 1,95 µg/mL. A hemólise total foi alcançada com 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), enquanto o PBS foi usado como controle negativo. Após, a placa foi encubada durante 60 min à temperatura ambiente (28±5°C) ao abrigo da luz, e em seguida a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novas microplacas para medir a absorbância (540 nm) da hemoglobina liberada (SILVA et al., 2016; DA SILVA et al., 2020). A atividade hemolítica relativa foi expressa em relação ao Triton X-100, calculada pela seguinte fórmula:

Atividade hemolítica relativa (%) = [(As - Ab) × 100] / (Ac - Ab); Onde (Ab) é a absorbância do controle (em branco, sem extrato), (As) representa a absorbância na presença do extrato e (Ac) representa a absorbância na presença de Triton X-100. Os ensaios foram realizados em quintuplicata em dois experimentos independentes.

4.8 Ensaio da toxicidade aguda em larvas de *T. molitor*

As larvas de *T. molitor*, entre 10° e 12° estágio larval, foram adquiridas comercialmente. Para a manutenção, as larvas foram acondicionadas em recipientes plásticos, cobertos com tela e ao abrigo da luz com temperatura e umidade controlada (28 ± 3°C) e alimentação a base da mistura de farelo de trigo, farinha de mandioca, farinha de rosca e aveia na proporção de 3:1:1:1 em peso. As larvas que apresentaram alterações em sua cor ou na motilidade foram descartadas e somente foram utilizadas nos ensaios as que estavam saudáveis (FAZOLIN et al., 2007; SOUZA et al., 2015; NAVARRO et al., 2019).

O teste de toxicidade aguda foi realizado como descrito por Wang et al. (2015) e Alves et al. (2019), com adaptações. Foram utilizadas larvas com o peso entre 0,2 e 0,3 g, e tamanhos similares (10 a 20 mm). A formação dos grupos foi de acordo com a concentração do ECL (1, 10, 100 e 1000 µg/kg) e controles, descrito na **Tabela 3**. O procedimento ocorreu utilizando injeções (10 µL) com o auxílio de seringa analítica, pela via intrahemocélica,

aplicada entre quarto e quinto metâmero, na porção ventral, após imobilização das larvas por resfriamento, visto de acordo com o esquema ilustrativo **Figura 4**. Após o tratamento as larvas foram transferidas para placas de Petri, contendo ração padronizada, incubadas ao abrigo da luz, em câmaras com temperatura e umidade favorável e controlada. A sobrevivência foi monitorada diariamente, durante 168 horas e a morte das larvas foi avaliada considerando ausência de motilidade e presença de melanização. Os ensaios foram realizados em triplicata em grupos com n=10 larvas, e agrupados para construir curvas de sobrevivência.

Grupo	Descrição
Ctrl limpo	Larvas sem tratamento
Ctrl letalidade	Larvas tratadas com acetato de etila
Ctrl trauma	Larvas que receberam somente o trauma sem injeção de substâncias
Ctrl negativo	Larvas tratadas com PBS estéril
ECL 1	Larvas tratadas com 1 µg/kg do ECL
ECL 10	Larvas tratadas com 10 µg/kg do ECL
ECL 100	Larvas tratadas com 100 µg/kg do ECL
ECL 1000	Larvas tratadas com 1000 µg/kg do ECL

Tabela 3. Descrição dos grupos experimentais do ensaio da toxicidade aguda em larvas de *T. molitor*. (Ctrl) Controle e (ECL) Extrato de *C. lunata*.

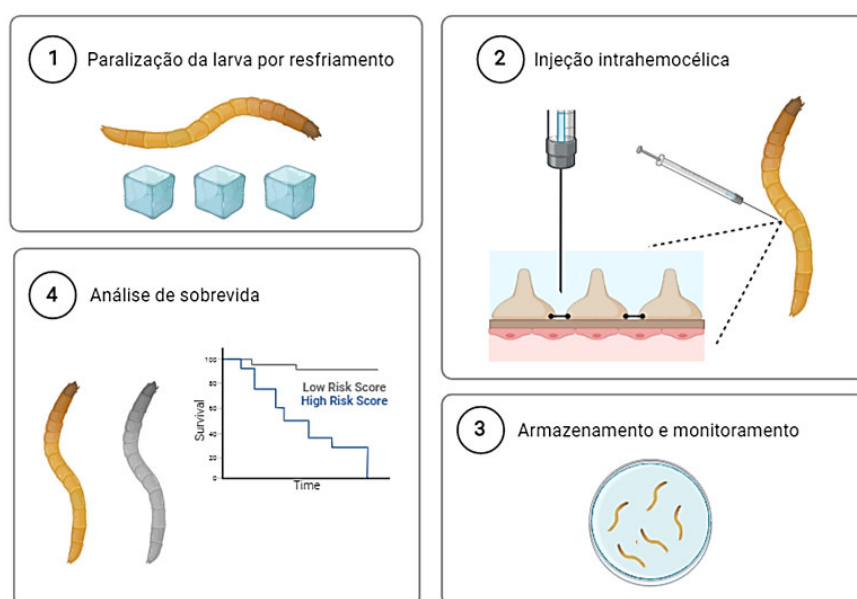


Figura 4. Esquema ilustrativo do ensaio da toxicidade aguda em larvas de *T. molitor*. Fonte: Autor.

4.9 Avaliação antimicrobiana *in vitro* do ECL

4.9.1 Microrganismos

Cepas microbianas padrão de *S. aureus* (ATCC®25923™), *E. coli* (ATCC®25922™) e *C. albicans* (ATCC®90028™) foram fornecidas pelo Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão. As bactérias foram cultivadas em Ágar Mueller Hinton e a levedura em ASD, os microrganismos foram incubados a 37°C por 24h, deixando-os viáveis para os posteriores ensaios.

4.9.2 Ensaio turbidométrico à base de resazurina para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

O ensaio turbidométrico baseado em resazurina, foi descrito de acordo com Sharma et al. (2021) adotado para demonstrar os efeitos de inibição do ECL em cepas padrão de *S. aureus*, *E.coli* e *C. albicans*, sendo aplicada a metodologia da microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes analíticas do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), descrita nos documentos M7-A11 e M27-A2, com algumas adaptações (CLSI, 2012; CLSI, 2018). Para os isolados bacterianos (*S. aureus* e *E.coli*), inicialmente foi realizado a padronização do inóculo de acordo com a escala de Macfarland 0,5 e suspensos em solução salina estéril e transferido 10 µL da suspensão bacteriana para microplacas de titulação contendo 190 µL/poço de Caldo Muller Hinton (Merck Millipore) com a presença de diferentes concentrações do ECL (1000 a 7,8 µg/mL). Diluições seriadas de Vancomicina (8 a 0,06 µg/mL) e Gentamicina (10 a 0,07 µg/mL) foram utilizados como controles positivos ao teste. As amostras foram incubadas por 24 h a 37°C. Para o isolado fúngico de *C. albicans*, 100 µL do inóculo padrão foram transferidos para poços da microplaca juntamente com o meio RPMI-1640-MOPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Foram adicionados os diferentes tratamentos do ECL descritos anteriormente, e como controle positivo foi utilizado o antifúngico Anfotericina B (16 a 0,125 µg/mL). As placas foram mantidas a temperatura de 37°C por 24 e 48h. Após o período de incubação para ambos os microrganismos, foi adicionado 30 µL de resazurina (0,01%) e, em seguida, as placas foram reincubadas a 37°C por 24 h. A mudança de cor de azul para rosa indica redução de resazurina e, portanto, crescimento microbiano, sendo a CIM registrada. O ensaio foi realizado em quintuplicata e os valores expressos em média correspondendo a dois experimentos independentes.

4.9.3 Ensaio da concentração bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínima

A partir dos poços nos quais não houve crescimento microbiano visível, no teste da CIM anterior, foi pipetado alíquotas de 10 µL, a qual foi inoculada na superfície do AMH e ASD. As placas foram incubadas a 36°C e após 24 horas, foi definida a CFM/CBM como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicata (SANTUARIO et al., 2007).

4.9.4 Ensaio do biofilme em superfície abiótica

O ensaio da formação do biofilme para *S. aureus* e *E. coli*, foi realizada de acordo com Ferro et al. (2016) e Monteiro-Neto et al. (2020). Para isso, foram adicionados 10 µL de cada suspensão bacteriana (preparada conforme descrito acima) em uma placa de microditutação de 96 poços contendo concentrações inibitórias e subinibitórias do ECL e drogas padrão (Vancomicina e Gentamicina) (CIM; 2/MIC; 4/CIM) em 190 µL de CMH (Merck Millipore). Bactérias sem tratamento foram usadas como controles negativos (100% do biofilme formado). As amostras foram incubadas a 37°C por 24 h e, em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS estéril. As amostras foram então fixadas com 200 µL de metanol PA por 15 min. Em seguida, o metanol foi removido e os poços da placa deixados secar a temperatura ambiente. O biofilme foi corado com 5% de cristal violeta (CV) (Sigma-Aldrich) por 10 min em temperatura ambiente, e imediatamente solubilizado com metanol (200 µL). A absorbância foi lida a 570 nm. Os resultados de massa do biofilme são expressos em percentual de redução.

Para a levedura (*C. abicans*) o ensaio do biofilme foi preconizado por Da Silva et al. (2020). O inóculo foi cultivado em meio de base de nitrogênio de levedura (YNB; Sigma-Aldrich) suplementado com 50 mM de glicose e foi incubado a 37° C por 18 h. A suspensão microbiana foi então centrifugada a 1666 g (Centrifuge 5810R, Eppendorf) por cinco minutos, e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS estéril e depois ressuspenso em 5 mL de PBS. As densidades ópticas do inóculo foram ajustados para 1×10^7 UFC/mL. Além disso, 200 µL de cada uma da suspensão da levedura foi transferido para placas de 96 poços e incubadas por 90 min a 37° C para obter adesão. Em seguida, os sobrenadantes foram aspirados e os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para remover quaisquer células não aderidas, e o resultante de células fúngicas aderidas ao fundo da placa compreende o pré biofilme, após, os poços correspondentes ao teste receberam 200 µL/poço de YNB com os tratamentos do ECL e droga padrão (Anfotericina B) descrito anteriormente. A placa foi reincubada a 37°C

durante 24h. Para a quantificação da biomassa foi utilizado o método de coloração com CV descrito por Zago et al. (2015). Após o período de 24h os poços teste da placa foram submetidos a três lavagens com PBS estéril e após 200 µL de metanol 95% (v/v) foi adicionado para a fixação do biofilme, seguido de 15 min de incubação. Além disso, o metanol foi removido e as placas foram secas durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de cristal violeta (1% v/v) foi adicionados a cada poço e a amostra foi incubada durante cinco minutos com a coloração. A placa foi lavada duas vezes com PBS e 200 µL de ácido acético (33% v/v) foi adicionado a cada poço. Para obter os valores de absorbância, 100 µL de cada um dos poços de amostra foram transferidos para uma nova microplaca de 96 poços e lidos a 570 nm. Os resultados foram expresos em percentual de redução da biomassa do biofilme em formação. Ambos os ensaios foram realizados em quintuplicata em dois experimentos independentes.

4.9.5 Ensaio das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) do biofilme microbiano

Após o período de 24h de incubação dos microrganismos junto aos tratamentos do ECL e drogas padrão, as microplacas de 96 poços foram submetidas a duas lavagens com PBS estéril. Os biofilmes aderidos no fundo da placa foram coletados por raspagem pelo processo de fricção por uma ponteira estéril, e após foram suspensos em 100 µL de PBS estéril. As UFC's foram determinadas por diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) do biofilme, seguindo plaqueamento de 20 µL de cada amostra (triplicata) na superfície de placas de petri contendo AMH e ASD, e após as placas foram incubadas a 37° C por 48 h (ZAGO et al., 2015; GAIO; CERCA, 2020).

4.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.2. Para os ensaios *in vitro* foram realizadas repetições em quintuplicata em dois experimentos independentes, sendo aplicado teste de normalidade e os resultados gerados avaliados por Análise de Variância Univariada (ANOVA) para comparações múltiplas ou por Teste T para duas amostras. Já para o ensaio *in vivo* com modelo alternativo invertebrado, foi utilizado curvas de sobrevivência segundo o método de Kaplan-Meier e a análise estatística foi realizada pelo Teste de Log-rank (Mantel-Cox). Em todos os ensaios a significância foi considerada quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação molecular de *Curvularia* sp.

A caracterização molecular é vista na **Figura 5** e revela a eficácia do protocolo de extração de DNA preconizado por Valenzuela-Lopes et al. (2017) com adaptações. A quantificação do DNA do isolado fúngico variou entre 585,1 e 620,2 ng/ μ L com o grau de pureza entre 1,4 e 1,6 nm. No ensaio da PCR, utilizando primers específicos para *Curvularia* sp e *C. lunata*, o amplicon obtido para o gênero e espécie apresentou respectivamente, 226 bp e 215 bp, confirmando o isolado pertencente ao gênero *Curvularia* e espécie *lunata*.

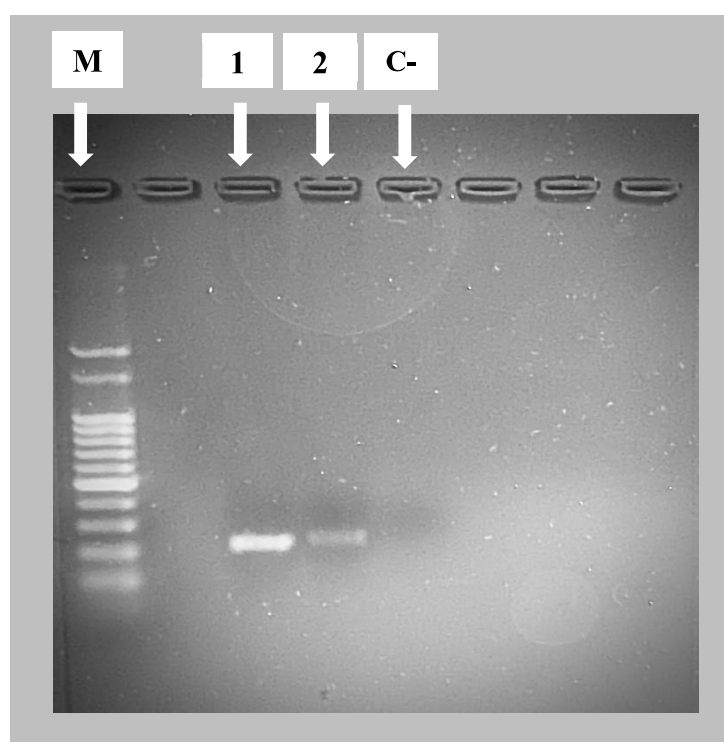


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação com iniciadores específicos para *Curvularia* sp e *C. lunata*. M: marcador molecular de 100 bp; 1: *Curvularia* sp; 2: *C. lunata* 3:C-: controle negativo (SuperMix e primers).

5.2 O ECL apresenta efeito atóxico para eritrócitos

A atividade hemolítica do ECL foi realizada utilizando eritrócitos de carneiro e apresentou baixa citotoxicidade, visto na **Figura 6**. Mesmo nas duas maiores concentrações testadas (500 e 1000 μ g/mL), o extrato induziu níveis de hemólise de 4,2% e 9,6%, respectivamente.

5.3 O ECL garante a sobrevivência das larvas de *T. molitor*

A avaliação da toxicidade aguda do ECL (**Figura 7**) mostrou que o tratamento com concentrações entre 1 e 100 $\mu\text{g/Kg}$, resultou em sobrevida de 100% das larvas até o final da avaliação. Entretanto, a maior concentração do ensaio (1000 $\mu\text{g/Kg}$) apresentou toxicidade para as larvas, obtendo mortes em 12h (87,5% de sobrevivência) e em 24h (75% de sobrevivência), após esse período não foram evidenciadas mortes até o período de 168h. Além disso, é observado a seguridade do procedimento pelos grupos controles (Ctrl) limpo, trauma e negativo que apresentaram 100% de sobrevivência e o Ctl letalidade que apresentou 100% das mortes em 12h.

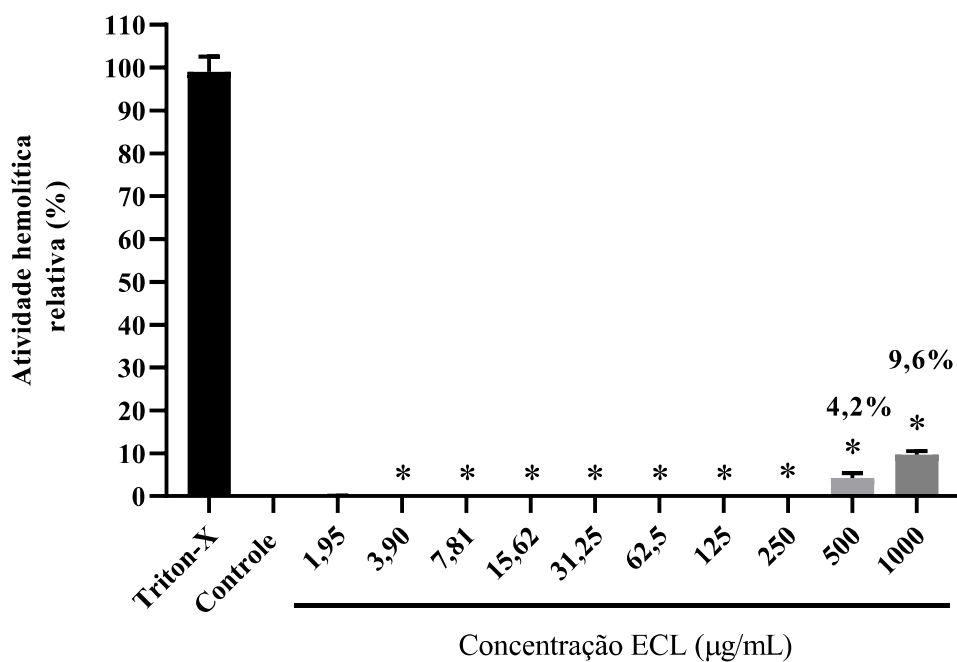
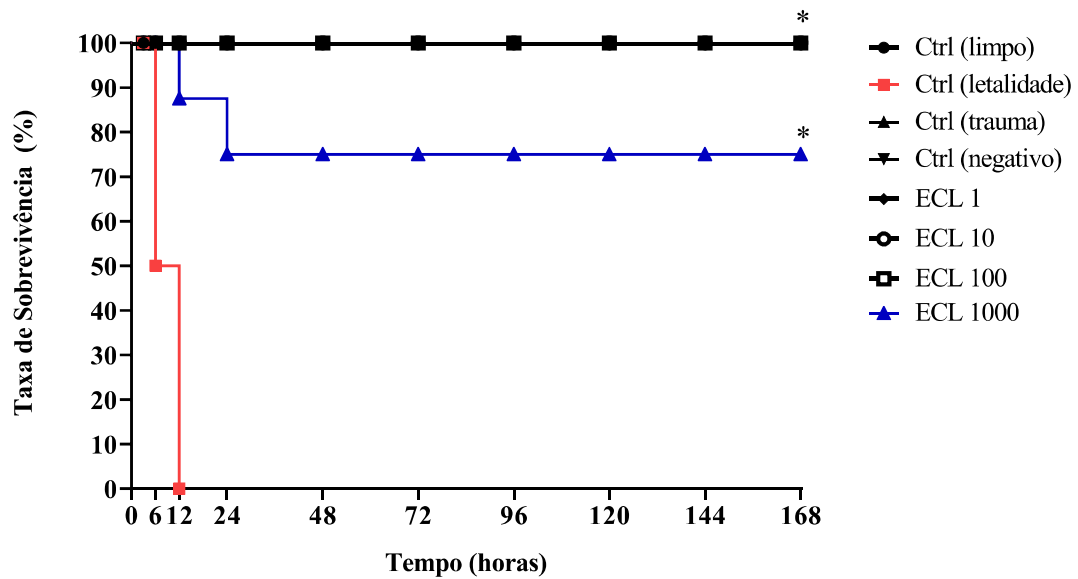


Figura 6. Avaliação de toxicidade do Extrato de *C. lunata* (ECL) em eritrócitos de carneiro. O percentual de atividade hemolítica foi comparado ao Controle (+) Triton X-100, como controle de 100% hemólise; Controle (-) eritrócitos tratados com PBS. Os dados foram analisados por ANOVA com o pós-teste de Tukey, com (*) $p < 0,05$.

A



B

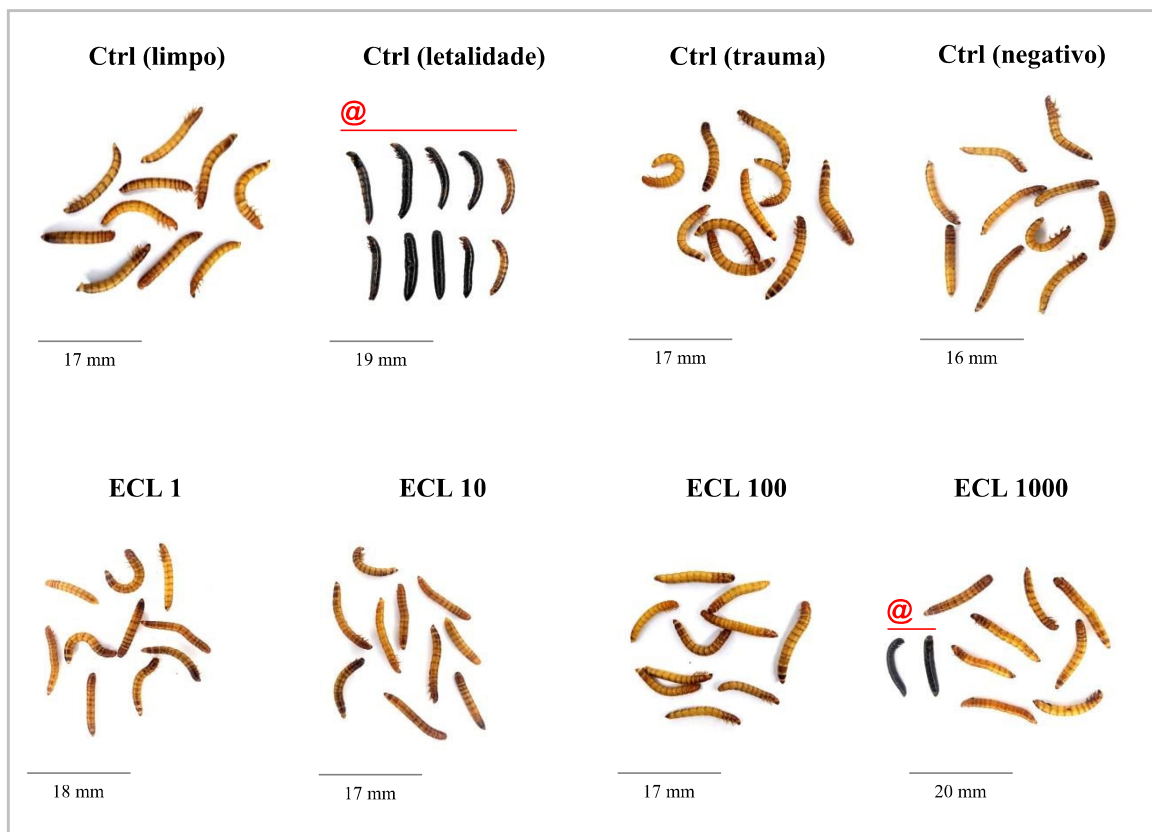


Figura 7. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de *C. lunata* (ECL) em larvas de *T. molitor*. (A) Curvas de sobrevivência; larvas tratadas com concentrações (10×) de forma crescente do ECL, variando entre 1 a 1000 µg/Kg, sendo avaliada a sobrevivência (%) pelo teste de Log-Rank (Mantel-Cox); (*) representa diferenças estatísticas entre os grupos teste e (B) Fotografias das larvas em seus referidos grupos teste; (@) indica larvas mortas com o processo de melanização.

5.4 Efeito antimicrobiano do ECL em *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*

O efeito antimicrobiano do ECL está descrito de acordo com a **Tabela 4**, e revela concentrações inibitórias para todas as cepas microbianas testadas, com variações da CIM entre 87,5 a 800 µg/mL e CBM entre 162,5 e 1000 µg/mL e CFM de 1000 µg/mL. O perfil antimicrobiano para *S. aureus* apresentou melhor eficácia (87,5 µg/mL-CIM; 162,5 µg/mL-CBM) em comparação as outras cepas teste, que revelaram valores elevados em relação ao perfil inibitório das drogas padrão com valores da CIMs entre 1,2 a 12 µg/mL.

Microrganismo	ECL		Vancomicina
	CIM	CBM	CIM
<i>S. aureus</i>	87,5	162,5	1,2
Gentamicina			
	CIM	CBM	CIM
<i>E. coli</i>	800	1000	1,5
Anfotericina B			
	CIM	CFM	CIM
<i>C. albicans</i>	700	1000	1

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) - µg/mL.

5.5 O ECL interfere na formação do biofilme microbiano

O biofilme em formação foi tratado com as concentrações do ECL e drogas padrão descritas na **Tabela 5**. Na **Figura 8** é observado os percentuais de redução da biomassa do biofilme de acordo com a espécie microbiana. A incubação do ECL junto à formação do biofilme de *S. aureus* apresentou reduções significantes (<0.0001; Figura 8A) em CIM (65,6%) e 2/CIM (69,9%), para 4/CIM é visto o percentual elevado de 83,7% em comparação ao crescimento máximo do biofilme (controle) e para o controle da droga padrão (vancomicina) as reduções são expressivas em CIM e 2/CIM (<0.0001; Figura 8D) com percentuais de 58% e 70%, respectivamente, não apresentando redução no tratamento de 4/CIM. No perfil de redução do biofilme de *E. coli*, o ECL mostrou melhor eficácia em CIM com 31,7% (<0.0001; Figura 8B) comparado a droga padrão (gentamicina) que apresentou CIM com reduções de 86,3% (0.0014; Figura 8E), os demais tratamentos de ambas as substâncias apresentaram percentuais de redução acima de 90%. Para *C. albicans*, é visto

resultados significantes (<0.0001 ; Figura 8C) para todas as concentrações do ECL testadas, com CIM (33,3%), 2/CIM (48,9%) e 4/CIM (50,1%) em comparação com a droga padrão (anfotericina B) que apresentou reduções em CIM de 36% (<0.0001 ; Figura 8F) e comportamento semelhante de 87% de redução nas concentrações de 2/CIM e 4/CIM (0.0230; 0.0163; Figura 8F).

Tratamento	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	ECL	Vancomicina	ECL	Gentamicina	ECL	Anfotericina B
CIM	87,5	1,2	800	1,5	700	12
2/CIM	43,75	0,6	400	0,75	350	6
4/CIM	21,87	0,3	200	0,37	175	3

Tabela 5. Descrição das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do tratamento do biofilme em formação.

5.6 O ECL diminui as Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) do biofilme

Para o tratamento dos biofilmes microbianos foram utilizados os tratamentos descritos anteriormente (**Tabela 4**) e os resultados da interferência do ECL e drogas padrão nas UFC's dos microrganismos testados, estão descritos de acordo com a **Figura 9**. Foi observado que o número de redução das células microbianas foi expresso para o ECL somente para os tratamentos utilizando CIM, com reduções em *S. aureus* ($2,6 \times 10^5$ UFC/mL; Figura 9A) e para *C. albicans* ($3,5 \times 10^5$ UFC/mL; Figura 9C).

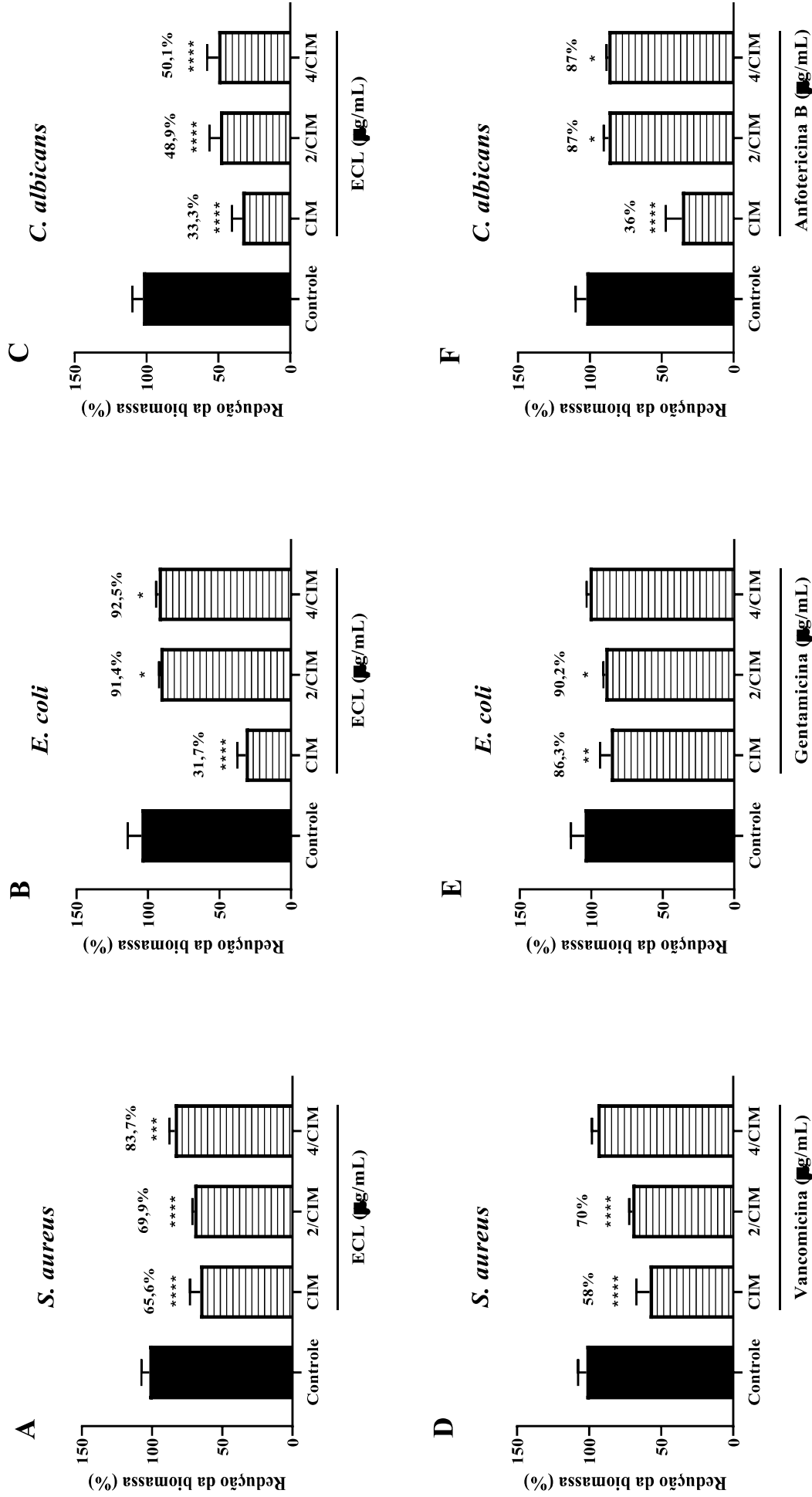


Figura 8. Efeito do ECL e drogas padrão na biomassa do biofilme de (A e D) *S. aureus*, (B e E) *E. coli* e (C e F) *C. albicans*. Os dados representam a média $\pm$ SD de 5 replicatas, sendo utilizada análise de variância ANOVA; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

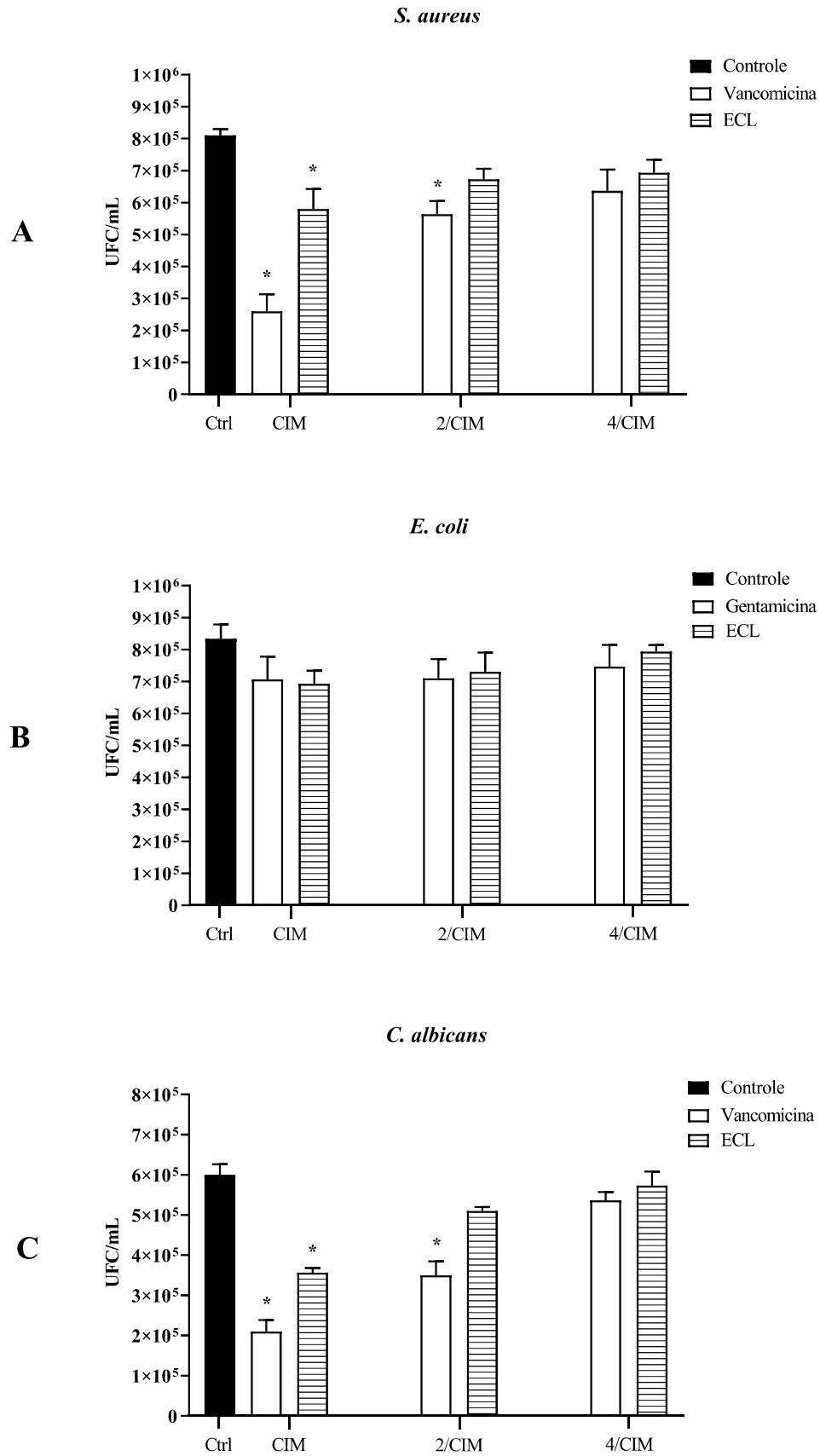


Figura 9. Número de unidades formadoras de colônias (UFC's) por biofilme microbiano de (A) *S. aureus*, (B) *E. coli* e (C) *C. albicans*; (*) $P < 0,05$; (Ctrl) Indica controle sem tratamento.

6. DISCUSSÃO

A identificação de espécies fúngicas é um desafio no ramo das ciências biológicas, pois, a variação fenotípica pode ser confundida, uma vez que, para esta área, grande parte da determinação de gênero e espécie é dada pelas chaves de identificação, que são baseadas em características macro e microscópicas, obtidas através da cultura e visualização microscópica das estruturas (MARTINS et al., 2006; BLACKWELL, 2011; FIERER, 2017).

Segundo Sun et al. (2003), as características morfológicas de *Curvularia* sp. não fornecem informações precisas para a elucidação do gênero e espécie, sendo necessário proceder com análises baseadas no perfil molecular. E com isso, as tecnologias moleculares garantem uma especificidade na identificação de espécies, gerando um conteúdo seguro e eficaz na aplicação nos diferentes setores, como indústria, biotecnologia e saúde humana (NODVIG et al., 2015; DO ESPÍRITO SANTO et al., 2020).

Para a identificação molecular do isolado ambiental de *Curvularia* sp. deste estudo, foi utilizado desenhos de primers direcionados para gênero e espécie, sendo a região ITS do rDNA relatada na literatura como uma sequência capaz de auxiliar na identificação de diferentes gêneros fúngicos (RHODEN et al., 2013; SONG et al., 2018). De acordo com Da Silva Ribeiro et al. (2021) as sequências parciais das regiões ITS1-5.8S-ITS2, fator de alongamento 1-alfa, genes da β -tubulina, actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e calmodulina, identificou diferentes gêneros de fungos endofíticos associados a espécie vegetal *Serjania laruotteana* e dentre eles o gênero *Curvularia*. Em outro estudo realizado por Cui e Sun (2012) foi isolado *C. lunata* de lesões das folhas de *Nelumbo nucifera*, sendo realizado a caracterização molecular baseada na sequência de rDNA pela região ITS1-5.8S-ITS2 amplificando os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

O gene da proteína Ras Clg2p tem sido utilizado como um marcador molecular para identificar alguns fungos pois os éxons são conservados e íntrons variáveis em quase todas as espécies fúngicas, além disso, este gene demonstra regiões variáveis entre *C. lunata* e outros fungos (HOU et al., 2013). Neste estudo, construímos primers inéditos para amplificar fragmentos curtos dos dois referidos marcadores, amplificando de forma precisa a espécie de interesse.

No contexto da abordagem dos extratos obtidos a partir de fungos, a literatura revela poucos estudos com esta aplicação e vale ressaltar, que a obtenção de novos bioprodutos serve de perspectiva de aplicabilidade em diferentes setores da atividade humana (YAN et al.,

2019). De acordo com Liu e Liu (2018) os extratos obtidos a partir de fungos filamentosos são fontes ricas em biomoléculas com aplicações medicinais e os principais metabólitos secundários encontrados são divididos principalmente em: policetídeos, peptídeos não ribossômicos, alcalóides e terpenos.

Dentre os principais alvos de investigação neste campo, encontram-se os fungos endofíticos, que estão agregados a algumas espécies vegetais e devido ao seu ambiente de vida especial, esses tipos de fungos produzem muitos metabólitos bioativos com diversas características estruturais de importância farmacêutica e ecológica (ANCHEEVA; PROKSH, 2020; KHALMURATOVA et al., 2021).

No estudo de Polli et al. (2021), foi analisado a atividade biológica *in vitro* do extrato dos metabólitos secundários produzidos por *Curvularia* sp, apresentando efeito antioxidante pelos ensaios DPPH (22,5%) e ABTS (62,7%), atividade inibitória da butirilcolinesterase (BuChE; IC 50 = $110 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$) e após análises espectroscópicas e de espectrometria de massa, tendo o composto asperpentina como um componente importante encontrado no extrato, pois possui complexidade estrutural atraente, diversos grupos funcionais e uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo atividade inibitória de enzimas específicas. Em outro estudo realizado por Couttolene et al. (2016) a espécie de *C. trifolii* foi isolado do ambiente marinho e produzido o extrato metanólico e após submetida a ensaios *in vitro* contra cinco linhagens celulares PG de 17 HBL-100, 19 HeLa, 23 SW1573, -6 T-47D e 10 WiDr, apresentando percentagem de crescimento < 50%.

Na avaliação do efeito hemolítico do ECL, foram observados baixos percentuais de hemólise, correspondendo as maiores concentrações testadas em 500 $\mu\text{g/mL}$ (4,2%) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (9,6%), esses resultados mostraram que a alta dosagem testada não afetou a integridade das hemácias, revelando a biocompatibilidade do extrato do fungo, e de acordo com Amin e Dannenfelser (2006), quando a porcentagem de hemólise não excede 10%, a substância teste pode servir como um agente não tóxico.

A avaliação da citotoxicidade através de testes de atividade hemolítica é um método alternativo de triagem para toxicidade simples. É rápido, reproduzível e barato para avaliar a atividade hemolítica dos eritrócitos diante muitos compostos; um fato que permite reduzir o uso de animais de laboratório para testes *in vivo*, tendo em vista que os eritrócitos estão entre as células mais predominantes no ser vivo e seu principal papel é o transporte de oxigênio e danos gerados a essa linhagem celular podem afetar os componentes da membrana e promover a hemólise, com a consequente perda de sua função vital (JENNINGS, 2015; RAHAMOOZ-HAGHIGHI et al., 2021).

O perfil da toxicidade aguda em modelo invertebrado revelou letalidade do ECL no intervalo de tempo de 12 e 24h após a administração de 1000 µg/kg, apresentando uma sobrevivência final de 75% até as 168h da análise.

A avaliação da toxicidade aguda é um importante parâmetro no desenvolvimento de novas substâncias bioativas, visto que trazem informações sobre os riscos e os possíveis efeitos adversos e deletérios, quando se trata de substâncias desconhecidas. Sobretudo se considerarmos que os extratos são complexos químicos com metabólitos capazes de desencadear reações deletérias ao organismo humano ou de outros animais (FLANAGAN et al., 2008; HE; WAN, 2018).

As respostas orgânicas geradas nas larvas frente a maior dose do tratamento do ECL, pode ter resultado em efeitos oxidativos devido à presença de substâncias, que em elevadas concentrações, ocasionaram morte tecidual no animal (KOCAK et al., 2018). E vale ressaltar, que os modelos experimentais baseados em larvas não substituem por completo os modelos de animais vertebrados, pois estes apresentam uma maior complexidade em seus sistemas biológicos. Além disso, tudo indica que a aplicação deste parâmetro de toxicidade em modelo de larvas de *T. molitor* para o extrato proveniente de fungo é uma abordagem pioneira.

O efeito antimicrobiano do ECL revelou um amplo espectro de atividade em diferentes espécies microbianas com concentrações inibitórias que variaram entre 87,5 a 800 µg/mL, este resultado demonstra o potencial promissor do extrato, tendo em vista, uma escassez de estudos que fizeram à aplicação antimicrobiana de *C. lunata*. Porém, Nischitha et al. (2020) isolaram o fungo *C. tsudae* das folhas de *Cynodon dactylon*, e produziram um extrato de acetato de etila que foi testado seu efeito em cepas de *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescence* e *S. aureus* apresentando uma atividade moderada, enquanto o extrato metanólico apresentou atividade alta a moderada, com efeito antimicrobiano contra *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Fusarium oxysporum*. Neste mesmo estudo, foi realizada a caracterização química do extrato, sendo elucidado o composto majoritário cumarina. Alnufaie et al. (2020) mostraram a atividade do isolado cumarina contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) com CIM de 3,125 µg/mL. Essa molécula é igualmente potente na inibição do desenvolvimento do biofilme de MRSA e na destruição do biofilme pré-formado.

Para o perfil anti-biofilme do ECL foi obtido os melhores percentuais de redução da biomassa e das UFC,s nos tratamentos de CIM variando entre 31,7% a 65,6% e $2,6 \times 10^5$ UFC/mL a $3,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Este resultado é promissor, pois os efeitos agregados a compostos terapêuticos que agem nos fatores de virulência dos microrganismos

são alvos promissores para candidatos a antimicrobianos (HALL; MAH; 2017; YIN et al. 2019).

Os biofilmes são comunidades de microrganismos que estão aderidos a uma superfície biótica ou abiótica e desempenham um papel significativo na persistência da infecção. As bactérias e fungos dentro de um biofilme apresentam maior resistência aos tratamentos baseados em antimicrobianos, em comparação com os microrganismos em sua forma planctônica. Até agora, nenhuma droga está em uso clínico que visa especificamente à erradicação ou profilaxia na formação do biofilme. Isso provavelmente ocorre porque recentemente os detalhes moleculares da formação do biofilme eram pouco compreendidos, além da relação de mecanismos adaptativos, espécies emergentes e baixos investimentos em pesquisa para este campo (RABIN et al., 2015; DEL POZO, 2018; DI SOMMA et al., 2020).

7. CONCLUSÕES

- A identificação molecular do isolado ambiental confirmou a espécie de interesse (*C. lunata*);
- O ECL apresentou baixa toxicidade em eritrócitos, mesmo testado nas maiores concentrações;
- A toxicidade aguda do ECL em larvas de *T. molitor* apresentou 75% de sobrevivência após tratamento de 1000 µg/mL;
- O ECL apresentou um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*;
- O ECL apresentou efeito anti-biofilme, reduzindo a biomassa do biofilme das espécies microbianas testadas.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; MANCHANDA, V.; VERMA, N.; BHALLA, P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 172-177, 2011.
- ALNUFAIE, R.; RAJ, KC, H.; ALSUP, N.; WHITT, J.; ANDREW CHAMBERS, S.; GILMORE, D.; ALAM, M. A. Synthesis and antimicrobial studies of coumarin-substituted pyrazole derivatives as potent anti-*Staphylococcus aureus* agents. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2758, 2020.
- AL-ODAINI, N.; WEI, J. Y.; ZHENG, Y. Q.; ZHENG, D. Y.; KHADER, J. A.; CAO, C. W. A Special Tinea Nigra Caused by *Curvularia lunata*: Case Report and Literature Review. **Mycopathologia**, p. 1-8, 2022.
- ALVES, D. R.; DA SILVA, W. M. B.; DOS SANTOS, D. L.; DE OLIVEIRA FREIRE, F. D. C.; VASCONCELOS, F. R.; DE MORAIS, S. M. Atividades antioxidante, anticolinesterásica e citotóxica de metabólitos de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 73684-73691, 2020.
- ALVES, A. V.; DE LIMA, F. F.; DA SILVA, T. G.; OLIVEIRA, V. S.; KASSUYA, C. A. L.; SANJINEZ-ARGANDONA, E. J. Safety evaluation of the oils extracted from edible insects (*Tenebrio molitor* and *Pachymerus nucleorum*) as novel food for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 102, p. 90-94, 2019.
- AMIN, KETAN; DANNENFELSER, ROSE-MARIE. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 6, p. 1173-1176, 2006.
- ANCHEEVA, ELENA.; DALETOS, GEORGIOS.; PROKSCH, PETER. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. **Current medicinal chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1836-1854, 2020.
- ANDRADE, J. T.; SANTOS, F. R.; LIMA, W. G.; SOUSA, C. D.; OLIVEIRA, L. S.; RIBEIRO, R. I.; FERREIRA, J. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationship studies of chalcone derivatives as potential anti-*Candida* agents. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 8, p. 702-712, 2018.
- ARASTEHFAR, A.; KHODAVAISY, S.; DANESHNIA, F.; NAJAFZADEH, M. J.; MAHMOUDI, S.; CHARSIZADEH, A.; BOEKHOUT, T. Molecular identification, genotypic diversity, antifungal susceptibility, and clinical outcomes of infections caused by clinically underrated yeasts, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*: an Iranian multicenter study (2014–2019). **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 264, 2019.
- ARIVUDAINAMBI, U. E.; ANAND, T. D.; SHANMUGAIAH, V.; KARUNAKARAN, C.; RAJENDRAN, A. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 340-345, 2011.

BENGYELLA, L.; IFTIKHAR, S.; NAWAZ, K.; FONMBOH, D, J.; YEKWA, E, L.; JONES, R, C.; ROY, P. Biotechnological application of endophytic filamentous bipolaris and *Curvularia*: a review on bioeconomy impact. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 1-14, 2019.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

CAVANNA, C.; SEMINARI, E.; PUSATERI, A.; MANGIONE, F.; LALLITTO, F.; ESPOSTO, M, C.; PAGELLA, F. Allergic fungal rhinosinusitis due to *Curvularia lunata*. **The new Microbiologica**, v. 37, n. 2, p. 241-245, 2014.

CLSI. INSTITUTE OF CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. Reference Method for Dilution Antifungal Susceptibility Test in Yeast Broth; Fourth informational supplement; M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2012.

COUTTOLENC, A.; ESPINOZA, C.; FERNÁNDEZ, J, J.; NORTE, M.; PLATA, G, B.; PADRÓN, J, M.; TRIGOS, Á. Antiproliferative effect of extract from endophytic fungus *Curvularia trifolii* isolated from the “Veracruz Reef System” in Mexico. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 8, p. 1392-1397, 2016.

CUI, R. Q.; SUN, X. T. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China. **Plant Disease**, v. 96, n. 7, p. 1068-1068, 2012.

DA SILVA, A, F.; DA ROCHA, C, Q.; DA SILVA, L, C, N.; CARVALHO, JÚNIOR, A, R.; MENDES, I, N, F, V.; DE ARARUNA, A, B.; MONTEIRO, C, A. Antifungal and Antivirulence Activities of Hydroalcoholic Extract and Fractions of *Platonia insignis* Leaves against Vaginal Isolates of Candida Species. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 84, 2020.

DA SILVA RIBEIRO, A.; POLONIO, J. C.; DOS SANTOS OLIVEIRA, J. A.; FERREIRA, A. P.; ALVES, L. H.; MATEUS, N. J.; PAMPHILE, J. A. Retrotransposons and multilocus sequence analysis reveals diversity and genetic variability in endophytic fungi-associated with *Serjania laruotteana* Cambess. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2179-2192, 2021.

DEL POZO, JOSE, LUÍS. Biofilm-related disease. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.

DI SOMMA, A.; MORETTA, A.; CANÈ, C.; CIRILLO, A.; DUILIO, A. Antimicrobial and antibiofilm peptides. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 652, 2020.

DO ESPÍRITO SANTO, E, P, T.; MONTEIRO, R, C.; DA COSTA, A, R, F.; MARQUES-DA-SILVA, S, H. Molecular identification, genotyping, phenotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon*, *Apiotrichum*, and *Cutaneotrichosporon* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 307-317, 2020.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J, L, V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M, R.; LIMA, M, S, D. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 113-120, 2007.

FERRO, T. A.; ARAÚJO, J. M.; DOS SANTOS PINTO, B. L.; DOS SANTOS, J. S.; SOUZA, E. B.; DA SILVA, B. L.; FERNANDES, E. S. *Cinnamaldehyde inhibits Staphylococcus aureus virulence factors and protects against infection in a Galleria mellonella model*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2052, 2016.

FIERER, NOAH. Abraçando o desconhecido: desvendando as complexidades do microbioma do solo. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579-590, 2017.

FILLAT, Ú.; MARTÍN-SAMPEDRO, R.; MACAYA-SANZ, D.; MARTÍN, JA, IBARRA, D.; EUGENIO, ME. Potencial de fungos endofíticos degradadores de lignina em biorrefinarias lignocelulósicas. In: **Endófitos: Produtividade e Proteção das Culturas**. Springer, Cham, p. 261-281, 2017.

FLANAGAN, R. J.; DUNK, L. Haematological toxicity of drugs used in psychiatry. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 23, n. S1, p. S27-S41, 2008.

FRANCO, A. C.; ROSSATTO, D. R.; DE CARVALHO RAMOS SILVA, L.; DA SILVA FERREIRA, C. Cerrado vegetation and global change: the role of functional types, resource availability and disturbance in regulating plant community responses to rising CO₂ levels and climate warming. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 19-38, 2014.

GAIO, VÂNIA.; CERCA, NUNO. Biofilm released cells can easily be obtained in a fed-batch system using ica⁺ but not with ica-isolates. **PeerJ**, v. 8, p. e9549, 2020.

GALLON, M. E.; BARROS, B. S. P.; SILVA, M. A.; DIAS, S. H. M.; ALVES DA SILVA, G. Determinação dos parâmetros anatômicos, físico-químico e fitoquímicos das folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 937-944, 2015.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, J. S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**, v. 15, n. 1, 2013.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 14, n. 26, 2016.

HALL, CLAYTON W.; MAH, THIEN-FAH. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 276-301, 2017.

HE, C.; WAN, H. Drug metabolism and metabolite safety assessment in drug discovery and development. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 14, n. 10, p. 1071-1085, 2018.

HERNANDEZ-RESTREPO, M.; MADRID, H.; TAN, Y. P.; DA CUNHA, K. C.; GENE, J.; GUARRO, J.; CROUS, P. W. Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 41, n. 1, p. 71-108, 2018.

HONG, J.; HAN, T.; KIM, Y. Y. Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: **A review**. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2068, 2020.

HOU, J, M.; MA, B, C.; ZUO, Y, H.; GUO, L, L.; GAO, S, G.; WANG, Y, Y.; LIU, T. Rapid and sensitive detection of *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot based on its C lg2p gene using semi-nested PCR. **Letters in applied microbiology**, v. 56, n. 4, p. 245-250, 2013.

JENNINGS, PAUL. The future of in vitro toxicology. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1217-1221, 2015.

KHALMURATOVA, I.; CHOI, D, H.; KIM, J, G.; LEE, I, S. Endophytic Fungi of Salt-Tolerant Plants: Diversity and Ability to Promote Plant Growth. 2021.

KIM, J. S.; LEE, D. H. Seed transmission of *Bipolaris coicis*, *B. cynodontis*, *B. maydis* and *Curvularia lunata* causing leaf blight of Job's tears. **Korean Journal Plant Pathology**, v. 14, n. 4, p. 287-293, 1998.

KOÇAK, E.; ERTÜRK, S.; YAMAN, M. O. Kültür Bitkilerinde Zararlı Olan Böceklerle Biyoteknolojik Mücadelede Son Yöntemler. **Ziraat Fakültesi Dergisi**, p. 10-18, 2018.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: **Advances in Endophytic research**. Springer, New Delhi, 2014. p. 231-256, 2014.

LAKHUNDI, S.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Pathogenesis of microbial keratitis. **Microbial pathogenesis**, v. 104, p. 97-109, 2017.

LAMOTH, F.; LOCKHART, S, R.; BERKOW, E, L.; CALANDRA, T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n.1, p. 4-13, 2018.

LIMA, A.; FURTADO, M. Espécies do género *Curvularia* (fungos anamórficos: Hyphomycetes) na ilha de Santiago, Cabo Verde. **Portugaliae Acta Biol**, v. 22, p. 145-156, 2007.

LIU, JIAJIA.; LIU, GANG. Analysis of secondary metabolites from plant endophytic fungi. In: **Plant pathogenic fungi and oomycetes**. Humana Press, New York, NY, p. 25-38, 2018.

LUNARDELLI NEGREIROS DE CARVALHO, P.; DE OLIVEIRA SILVA, E.; APARECIDA CHAGAS PAULA, D.; HONORATA HORTOLAN LUIZ, J.; IKEGAKI, M. Importance and implications of the production of phenolic secondary metabolites by endophytic fungi: a mini-review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 4, p. 259-271, 2016.

MADRID, H.; DA CUNHA, K. C.; GENÉ, J.; DIJKSTERHUIS, J.; CANO, J.; SUTTON, D. A.; CROUS, P. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 33, n. 1, p. 48-60, 2014.

MADRID, H.; CÁRCAMO, C.; TAPIA, C. *Curvularia spicifera*. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 5, p. 646-647, 2019.

MANAMGODA, D, S.; CAI, L.; MCKENZIE, E, H.; CROUS, P, W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K, D. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. **Fungal diversity**, v. 56, n. 1, p. 131-144, 2012.

MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A.; CASTLEBURY, L. A.; CHUKEATIROTE, E. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. **Phytotaxa**, v. 212, n. 3, p. 175-198, 2015.

MARIN-FELIX, YASMINA.; HERNANDEZ-RESTREPO, MARGARITA.; CROUS, PEDRO W. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. **Mycological Progress**, v. 19, n. 6, p. 559-588, 2020.

MARTINS, A.; LOUSADA, J.; BRANCO, I.; CAETANO, P. Factores Edafo-Ambientais Associados ao Declínio de *Quercus suber* em Portugal: Tentativa de Identificação e Dificuldades Encontradas. **Silva Lusit**, v. 14, p. 155-167, 2006.

MEDEIROS, T. R. D.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M.; SILVA, A. P. R. D.; SORATO, A. M. D. C.; PAIVA, G. Controle alternativo do fungo *Curvularia* sp com o uso de extratos alcoólicos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

MONTEIRO-NETO, V.; DE SOUZA, C. D.; GONZAGA, L. F.; DA SILVEIRA, B. C.; SOUSA, N. C.; PONTES, J. P.; FERNANDES, E. S. Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 15, n. 5, p. e0232987, 2020.

NAVARRO, M. O. P.; SIMIONATO, A. S.; PÉREZ, J. C. B.; BARAZETTI, A. R.; EMILIANO, J.; NIEKAWA, E. T. G.; ANDRADE, G. Fluopsin C for treating multidrug-resistant infections: in vitro activity against clinically important strains and *in vivo* efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2431, 2019.

NISCHITHA, R.; VASANTHAKUMARI, M. M.; KUMARASWAMY, B. E.; SHIVANNA, M. B. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical profiling of *Curvularia tsudae* endophytic in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 1-12, 2020.

PAMPHILE, J. A.; COSTA, A. T.; ROSSETO, P.; POLONIO, J. C.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista uningá**, v. 53, n. 1, 2017.

POLLI, A. D.; RIBEIRO, M. A. D. S.; GARCIA, A.; POLONIO, J. C.; SANTOS, C. M.; SILVA, A. A.; AZEVEDO, J. L. Secondary metabolites of *Curvularia* sp. G6-32, an endophyte of *Sapindus saponaria*, with antioxidant and anticholinesterasic properties. **Natural Product Research**, v. 35, n. 21, p. 4148-4153, 2021.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y.; BONSU, E.; SINTIM, H. O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future medicinal chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RAHAMOOZ-HAGHIGHI, S.; BAGHERI, K.; DANAFAR, H.; SHARAFI, A. Anti-proliferative properties, biocompatibility, and chemical composition of different extracts of plantago major medicinal plant. **Iranian biomedical journal**, v. 25, n. 2, p. 106, 2021.

RAMALINGMAM, P.; MUTHUKRISHNAN, S.; THANGARAJ, P. Biosynthesis of silver nanoparticles using an endophytic fungus, *Curvularia lunata* and its antimicrobial potential. **Journal Nanosci Nanoeng**, v. 1, n. 4, p. 241-247, 2015.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. *In silico* analysis of diverse endophytic fungi by using ITS1-5, 8S-ITS2 sequences with isolates from various plant families in Brazil. **Genet. Mol. Res**, v. 12, p. 935-950, 2013.

RIVET-DAÑON, D.; GUITARD, J.; GRENOUILLET, F.; GAY, F.; AIT-AMMAR, N.; ANGOULVANT, A.; HENNEQUIN, C. Rapid diagnosis of cryptococcosis using an antigen detection immunochromatographic test. **Journal of Infection**, v. 70, n. 5, p. 499-503, 2015.

SANTOS, P, R, R, D.; LEÃO, E, U.; AGUIAR, R, W, D, S.; MELO, M, P, D.; SANTOS, G, R, D. Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to *Andropogon* grass. **Bragantia**, v. 77, p. 326-332, 2018.

SANTURIO, J, M.; SANTURIO, D, F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P, R.; ALVES, S, H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.

SCHARMANN, U.; KIRCHHOFF, L.; CHAPOT, V, L, S.; DZIOBAKA, J.; VERHASSELT, H, L.; STAUF, R.; RATH, P, M. Comparison of four commercially available chromogenic media to identify *Candida albicans* and other medically relevant *Candida* species. **Mycoses**, v. 63, n. 8, p. 823-831, 2020.

SHARMA, MEGHA.; MALHOTRA, BHARTI.; KHANDELWAL, SHREYA. Drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria by broth microdilution method. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 306-310, 2021.

SILVA, A, P, S, A, D.; NASCIMENTO DA SILVA, L, C.; MARTINS DA FONSECA, C, S.; DE ARAUJO, J, M.; CORREIA, M, T, D, S.; CAVALCANTI, M, D, S.; LIMA, V, L, D. M. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of organic extracts from cleome spinosa Jacq. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 963, 2016.

SINGH, VINAYAK K.; KUMAR, ANIL. PCR primer design. **Mol. Biol. Today**, v. 2, n. 2, p. 27-32, 2001.

SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M.; BOCATE, K. P.; PANAGIO, L. A.; ITO, F. A.; ALMEIDA, R. S. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of microbiological methods**, 118, 182-186, 2015.

SONG, X. X.; ZHAO, Y.; SONG, C. Y.; LI, C. H.; SONG, Y.; CHEN, M. J.; TAN, Q. ITS1/5.8 S/ITS2, a good marker for initial classification of Shiitake culinary-medicinal *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) strains in China. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 3, 2018.

SUN, G.; OIDE, S.; TANAKA, E.; SHIMIZU, K.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Species separation in *Curvularia* “*geniculata*” group inferred from Brn1 gene sequences. **Mycoscience**, v. 44, n. 3, p. 239-244, 2003.

TAN, YU PEI.; CROUS, PEDRO, W.; SHIVAS, ROGER, G. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. **MycoKeys**, n. 35, p. 1, 2018.

TAYUNG, K.; SARKAR, M.; BARUAH, P. Endophytic fungi occurring in *Ipomoea carnea* tissues and their antimicrobial potentials. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 653-660, 2012.

TORRES, F. L.; BOGAS, A. C.; DE ANDRADE, P. H. M.; DE SOUSA, C. P.; LACAVA, P. T. Bioprospecção e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas do Cerrado. **Concillium**, v. 22, n. 2, p. 256-272, 2022.

VALENZUELA-LOPEZ, N.; SUTTON, D, A.; CANO-LIRA, J, F.; PAREDES, K.; WIEDERHOLD, N.; GUARRO, J.; STCHIGEL, A, M. Coelomycetous fungi in the clinical setting: morphological convergence and cryptic diversity. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 552-567, 2017.

WANG, X.; HAO, Q.; CHEN, Y.; JIANG, S.; YANG, Q.; LI, Q. The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, 2015.

WEBER, R. W. *Curvularia*. Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the **American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 97, n. 5, p. A4-A4, 2006.

WICKES, BRIAN L.; WIEDERHOLD, NATHAN P. Molecular diagnostics in medical mycology. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.

WHITE T, J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR J, W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. **Academic Press**, Inc., New York, pp. 315-322, 1990.

YAN, L.; ZHU, J.; ZHAO, X.; SHI, J.; JIANG, C.; SHAO, D. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 8, p. 3327-3340, 2019.

YIN, W.; WANG, Y.; LIU, L.; HE, J. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 2019.

ZAGO, C. E.; SILVA, S.; SANITÁ, P. V.; BARBUGLI, P, A.; DIAS, C, M, I.; LORDELLO, V, B.; VERGANI, C, E. Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123206, 2015.