



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



FELIPE RICARDO DE MELLO

**Isolamento e caracterização de fungos de manguezal e prospecção
de polipeptídeos bioativos**

SÃO VICENTE - SP

2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



Felipe Ricardo de Mello

Isolamento e caracterização de fungos de manguezal e prospecção de polipeptídeos bioativos

Monografia apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em Biologia marinha pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus do Litoral Paulista.

Orientador: Professor Dr. Leandro Mantovani de Castro

Co-orientadora: Professora Dr^a.Cristiane Angélica Ottoni

SÃO VICENTE - SP

2025

D376i de Mello, Felipe Ricardo
Isolamento e caracterização de fungos de manguezal e prospecção de polipeptídeos bioativos / Felipe Ricardo de Mello. -- , 2025
39 p.

Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente,
Orientador: Leandro Mantovani de Castro
Coorientadora: Cristiane Angélica Ottoni

1. Manguezal. 2. Bioprospecção. 3. Compostos bioativos. 4. Atividade biológica. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão ao Professor Leandro Mantovani, meu orientador, por sua orientação dedicada e generosa ao longo da graduação. Além de ser uma pessoa excepcional, é um professor por excelência: sempre atencioso, acessível, disposto a ensinar e constantemente empenhado em proporcionar novas oportunidades aos seus alunos. Sua presença foi essencial não apenas para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para a minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço também à minha coorientadora, Professora Cristiane Ottoni, cuja atenção, comprometimento e generosidade foram indispensáveis ao longo desta jornada. Uma profissional admirável, cuja dedicação e humanidade despertam em mim profundo respeito e admiração. Sou especialmente grato pelos momentos memoráveis e pelos ensinamentos que levarei para a vida, os quais também enriqueceram não apenas minha formação acadêmica, mas também pessoal.

Meus mais sinceros agradecimentos aos meus pais, alicerces inabaláveis da minha trajetória. À minha mãe, Alessandra Andréa Gentile de Mello, mulher forte, incansável e inteligente, e ao meu pai, Evandro Ricardo de Mello, homem de coragem silenciosa, racionalidade e generosidade imensa. Juntos, sempre fizeram o possível e o impossível para me oferecer uma base sólida, com amor, dedicação e presença constante. Seus esforços diários, conselhos, paciência e o orgulho que demonstram por cada pequena conquista foram combustíveis que me trouxeram até aqui. A eles devo muito mais do que palavras podem expressar.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de Iniciação Científica (Processo nº 2024/00041-3), essencial para o desenvolvimento deste projeto.

A todos vocês, meu muito obrigado, com todo o meu carinho e reconhecimento.

Resumo

Os manguezais representam ecossistemas costeiros altamente produtivos e ecologicamente relevantes, atuando como importantes áreas de reprodução, alimentação e abrigo para diversas espécies. No entanto, esses ambientes estão sujeitos a crescentes pressões antrópicas, como contaminação por poluentes e expansão urbana desordenada, que comprometem sua integridade ecológica. Apesar de sua importância, ainda há uma lacuna significativa de estudos direcionados a esses sistemas, especialmente no que tange à caracterização da microbiota local. Os microrganismos desempenham funções ecológicas essenciais nesses habitats, contribuindo para processos biogeoquímicos em um ambiente caracterizado por elevada carga de matéria orgânica e disponibilidade limitada de nutrientes. Dessa maneira, os fungos filamentosos se destacam como principais agentes na degradação da matéria orgânica, por sua capacidade de produzir ampla variedade de enzimas e compostos bioativos. Essas características, os fungos se tornam alvos promissores em estudos de bioprospecção voltados à identificação de compostos com potencial biotecnológico, como peptídeos antimicrobianos. Diante desse contexto e do potencial farmacêutico associado a microbiota de manguezais, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar fungos filamentosos a partir de sedimentos do manguezal no litoral sudeste de São Paulo, além de avaliar o potencial antimicrobiano do perfil proteico do secretoma frente às cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As análises revelaram a predominância dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, sendo este último responsável pelos resultados positivos nos ensaios de atividade antibacteriana. A ação mais evidente foi observada contra bactérias gram-positivas, especialmente *S. aureus* e *S. epidermidis*, indicando o potencial de cepas de *Trichoderma* na produção de compostos bioativos com potencial antimicrobiano.

Palavra-chave: Manguezal; bioprospecção; compostos bioativos; atividade biológica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
<i>Justificativas</i>	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Fungos.....	12
3.1.2 Isolamento de fungos filamentosos	13
3.2 Identificação morfológica e molecular.....	13
3.2.1 Crescimento Fúngico.....	14
3.2.2 Extração de DNA	14
3.2.3 Reação de PCR.....	15
3.2.4 Sequenciamento e identificação das espécies fúngicas.....	15
3.3 Preparação do extrato protéico e peptídico do secretoma fúngico	15
3.4 Testes de atividade biológica.....	16
3.4.1 Atividade Antibacteriana- Teste de sensibilidade a antibacteriano com método de disco-difusão.....	16
3.4.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	16
3.4.3 Determinação de capacidade antioxidante pelo método com DPPH.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Isolamento de fungos filamentosos	18
4.2 Identificação morfológica.....	19
4.3 Identificação molecular:.....	21
4.3.1 Extração de DNA e PCR.....	21
4.3.2 Sequenciamento e identificação das espécies fúngicas	22
4.4 Preparação do secretoma.....	23

4.4.1 Dosagem de proteínas e peptídeos do secretoma.....	23
4.5 Testes de atividade biológica.....	25
4.5.1 Atividade Antibacteriana - Teste de sensibilidade a antibacteriano com método de disco-difusão.....	26
4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC) com resazurina.....	29
4.5.3 Determinação de capacidade antioxidante pelo método com DPPH	30
5. DISCUSSÃO.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	33

1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são considerados um dos ecossistemas mais produtivos do planeta (ADELEKE; BABALOLA, 2021). São distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, situados entre a interface mar e terra. Segundo o mapeamento realizado pelo CSR/Ibama, no Brasil, o ecossistema manguezal apresenta uma extensão de aproximadamente 14.000 km² ao longo do litoral brasileiro (WIGOLD; SCHÄFFER, 2018). Isso representa 8,5% de toda cobertura mundial e cerca de 50% da cobertura na América do Sul. Cerca de 80% dos manguezais em território brasileiro estão distribuídos em três estados do bioma amazônico: Maranhão (36%), Pará (28%) e Amapá (16%) (Atlas brasil). Entretanto, o manguezal é um ecossistema vulnerável e ameaçado no mundo. Dados apontam que entre 1980 e 2000 cerca de 35% de todo esse ecossistema no mundo foi devastado (MOSCHETTO; RIBEIRO; DE FREITAS, 2021). No Brasil a perspectiva não é diferente, dados divulgados pelo Ibama revelaram que entre o período de 1980 e 2012 foi perdido mais de 100 mil hectares de manguezal no país (WIGOLD; SCHÄFFER, 2018). As principais ameaças da perda deste ecossistema, sobretudo no país, são principalmente pela expansão urbana, desenvolvimento de indústrias, portos marítimos, aquicultura, agricultura, além de problemas inerentes a cada uma das atividades citadas como por exemplo: poluição dos corpos hídricos, solo e desmatamento de grandes áreas que acarretam a perda de espécies locais (MOSCHETTO; RIBEIRO; DE FREITAS, 2021).

Os manguezais são característicos por conterem grande quantidade de sedimentos aeróbicos e anaeróbicos, ricos em matéria orgânica. A degradação da matéria orgânica em decorrência da atividade microbiana presente no ambiente, disponibiliza nutrientes para a base da cadeia trófica (BIBI et al., 2017). Por esse motivo, a comunidade microbológica nesses locais possui um papel crucial na reciclagem de nutrientes (ALVES et al., 2020). Dentre os agentes decompositores presentes nos solos de manguezal, destacam-se os fungos, cujo papel ecológico é fundamental para a comunidade biológica. Sua abundância e biodiversidade nesse ecossistema depende de diversos fatores como: diversidade de plantas, maturidade do mangue e os padrões físico-químicos, inclusive, os níveis de biomassa. (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013). As espécies de plantas representantes do gênero *Rhizophora* são exemplos que regulam abundância de fungos por meio de grandes quantidades de taninos e baixas concentrações de aminoácidos. Quando comparado com o gênero *Avicennia*, que possui níveis mais baixos de taninos e níveis maiores de aminoácidos, nota-se uma maior e mais rápida colonização de fungos (ADELEKE; BABALOLA, 2021). Em decorrência disso, observa-se que diferenças

bióticas e abióticas interferem na composição e diversidade da microbiota, sobretudo de fungos, no ambiente. Além da capacidade de degradação de muitos compostos, os fungos oriundos de manguezal despertam interesse pela sua capacidade de suportar condições estressantes comuns a esse ambiente, como por exemplo, alta salinidade, condições de hipóxia, variações de ondas e marés, entre outros (WU et al., 2018). Com base na capacidade de suportar condições rigorosas, organismos provenientes destes ambientes, recebem destaque e interesse em função das suas propriedades fisiológicas adaptativas que muitas vezes produzem compostos bioativos e metabólitos secundários para sobreviver e manter a homeostase em condições desfavoráveis (YADAV, 2021).

Em razão dessas características, os fungos de ambiente de manguezal têm um enorme potencial como fontes de novos metabólitos, moléculas bioativas, e outros usos biotecnológicos os quais podem ser aplicados comercial e industrialmente (DE PAULA et al., 2022). Diversas enzimas obtidas de fungos são conhecidas e utilizadas em muitas indústrias e no setor clínico. A glucose oxidase, por exemplo, possui aplicação no setor alimentício e clínico. Amilase, é outra enzima muito utilizada nas indústrias alimentícia, papilífera, têxtil e de fermentação. Desempenha diversas funções como: de melhoramento de textura do alimento, potencializador de detergente para eliminação de amido presente em restos de alimento, auxilia na degradação do amido presente em madeira diminuindo resistência e facilitando degradação da celulose e, por fim, é utilizada na confecção de cervejas. Já a celulase possui um enorme potencial nas indústrias papilíferas podendo atuar no processo de branqueamento da polpa de madeira, bem como auxiliar no tratamento de descarte de água e reciclagem de papel. (KATHIRESAN; KALAISELVAM, 2023).

Além dos usos e importância citados anteriormente, os fungos de manguezal também se destacam na indústria farmacêutica. Algumas espécies têm demonstrado atividade antibiótica, anticâncer, antidiabético, antiviral, anti-inflamatória e de drogas imunossupressoras (DESHMUKH et al., 2018), bem como potencial antiparasitário, antimalária, antioxidante, antifúngico etc. (KATHIRESAN; KALAISELVAM, 2023).

Como consequência direta do uso indiscriminado de antibióticos nas décadas passadas, a problemática de bactérias resistentes expandiu rapidamente, levando a uma busca por novos compostos com atividade biológica e antimicrobiana (RIGHI et al., 2020). Dentre algumas alternativas de antibióticos destacam-se os peptídeos ou proteínas antimicrobianas (AMP; *antimicrobial protein or peptide*). Estas moléculas são pequenas, estruturalmente diversas, com domínios catiônicos que são capazes de destruir micróbios através de uma grande variedade de mecanismos (SOUZA CÂNDIDO et al., 2011). Além disso, em alguns casos específicos os AMP podem ter atividade contra patógenos que são resistentes a antibióticos convencionais

(ALCAYAGA-MIRANDA; CUENCA; KHOURY, 2017). Outras proteínas provenientes de fungos amplamente exploradas, são as proteínas imunomoduladoras do inglês Fungal immunomodulatory protein (Fips). Estas possuem baixo peso molecular, compostas em média por 120 aminoácidos e apresentam atividade antitumoral, como inibição do crescimento celular, proliferação e indução à apoptose (LI; ZHENG; ZHOU, 2019). Além destes, em estudos recentes, o isolamento de “*peptaibols*” originário de fungos, especialmente *Trichoderma sp*, se mostrou promissor no uso como antimicrobiano e até mesmo antitumoral. São moléculas classificadas da família de peptídeos de comprimento curto, comumente alcançam de 5 a 20 aminoácidos e possuem características hidrofóbicas com altas proporções de α -aminoisobutirico (Aib), N-terminal acetilado e C-terminal contendo um álcool. Esta classe de peptídeo atua na membrana plasmática de organismos, modificando a atividade biológica, e induz a formação de canais que têm como consequência extravasamento do conteúdo citoplasmático e, como resultado, propulsiona a morte celular (RAMACHANDER TURAGA, 2020). No geral, os AMP são caracterizados de acordo com seu padrão físico-químico e estrutura secundária: β -folhas, α -hélice, forma estendida e looping. Basicamente são divididos em quatro tipos: peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs), peptídeos antimicrobianos catiônicos, peptídeo anfipático catiônico e peptídeos lineares catiônicos com α -hélice. Na maioria das vezes atuam interagindo na membrana plasmática dos microrganismos, embora em alguns casos podem agir inibindo ação enzimática e dobramento proteico. Além disso, devido a sua especificidade em interagir com moléculas negativas podem servir de vetores específicos para interagir com as superfícies negativas das células cancerígenas e bacterianas. (FALAH, et al 2023; DATTA, RAJEEV, CHATTOPADHYAY, 2023).

Justificativas

Tendo em vista o grau de ameaça e condições únicas inerente a este ambiente, somado com a escassez de informações sobre os fungos de sedimentos de manguezal, pode-se pressupor que o presente trabalho tem um grande potencial de contribuir com conhecimento para um tema ainda pouco explorado, em uma região com espécies de alto potencial biotecnológico e com risco iminente de degradação por ações antrópicas. Dadas essas condições, cresce a importância de estudos para conhecimento das espécies locais, bem como buscar utilizar recursos de forma mais sustentável e eficiente. Além da busca por novos compostos com foco em atividade antimicrobiana, o trabalho visa contribuir no entendimento da microbiota local, isolando e caracterizando os fungos mais recorrentes. Além disso, a bioprospecção contribui para uma utilização sustentável de recursos, geralmente renováveis, colaborando com a conservação dos

recursos estudados, uma vez que o conhecimento gerado pode revelar a importância de tais espécies para a sociedade ou mesmo torná-las economicamente atrativas e consequentemente gerar interesse de conservação e suas interações com o meio (BARRETT; LYBBERT, 2000). Portanto, o desenvolvimento deste trabalho pode contribuir e atender alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) no Brasil, ao estudar e procurar novos compostos farmacológicos visando a saúde e bem estar, além de contribuir com informações de conservação e o conhecimento da biodiversidade em ambientes sensíveis, ao identificar organismos locais com potencial biotecnológico. Esses dados podem auxiliar em decisões mais eficientes e sustentáveis relacionadas ao uso e preservação da biodiversidade local.

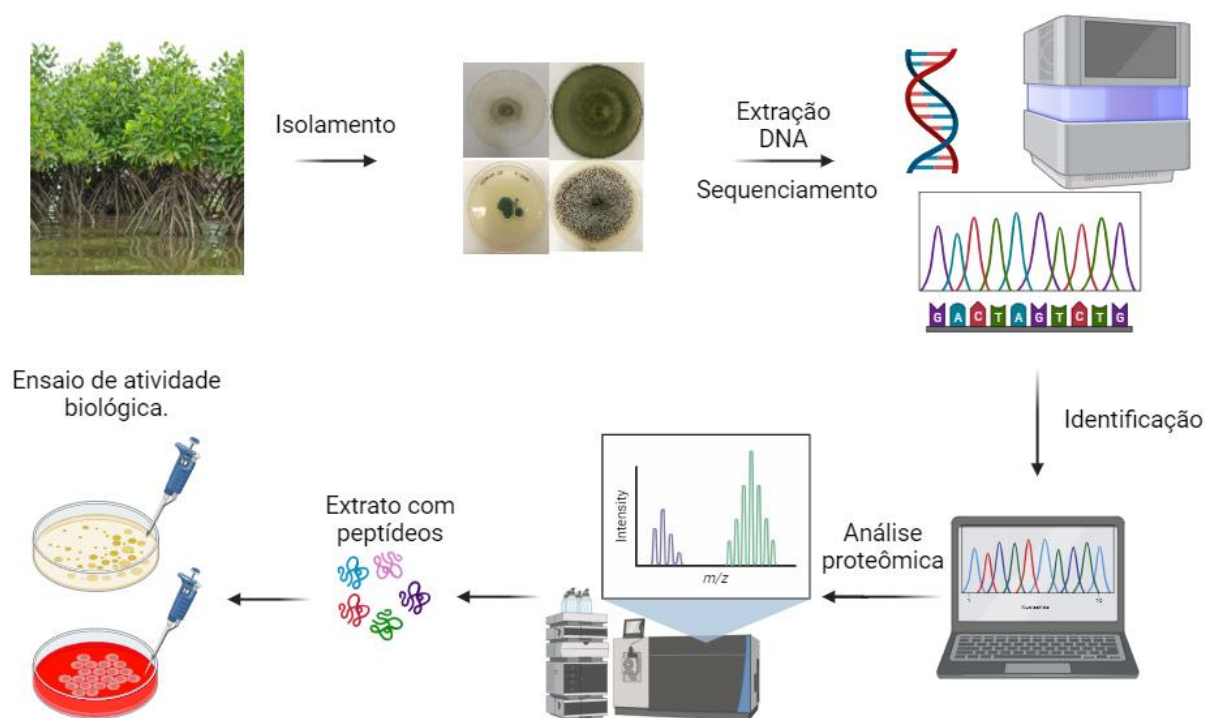


Figura 1: Fluxograma geral do trabalho com as etapas identificadas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo identificar morfologicamente e molecularmente fungos filamentosos de sedimentos de manguezal da região sudeste do litoral de São Paulo, cujas pesquisas são ainda escassas, além de, avaliar o potencial antimicrobiano a partir de extratos proteicos do secretoma das espécies estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fungos

As linhagens fúngicas foram isoladas de amostras de sedimentos do Mangue da região de Cananéia (24°58'32.8"S 47°54'38.1"O; 24°58'35.1"S 47°54'36.8"O) e Peruíbe (24°26'2.3"S 47°5'57.9"O; 24°26'2.3"S 47°5'57.9"O; 24°25'58.2"S 47°5'57.6"O; 24°25'58.0"S 47°5'56.8"O), no estado de São Paulo. Aproximadamente 50 gramas de sedimento foram coletados em diferentes pontos de amostragem, como representado na figura 2, em profundidade de 1 a 5 cm, dentro de um quadrante de 5 cm². Cada amostra foi acondicionada em frascos vidro, previamente esterilizados e transportados em caixas térmicas a fim de manter a temperatura ambiente. No laboratório, as amostras foram armazenadas em -20°C até o momento do isolamento fúngico.

Após o isolamento, os fungos foram caracterizados e armazenados junto à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas. Os fungos filamentosos foram preservados previamente em método Castellani a 4 °C e posteriormente criopreservados em glicerol, mantidos a -80 °C (GUIMARÃES,2011, TORTORA, 2011). Os mesmos foram subcultivados a fim de garantir seu isolamento. Para os ensaios foram reativados em placas de Petri contendo ágar-batata-dextrose (BDA) e incubados a 30 °C durante um período de 7 dias. Feito isso, as colônias crescidas foram utilizadas como fonte de inóculo para o crescimento dos fungos em meio líquido.



Figura 2: Figura A: Pontos de coleta na região da Barra do Una, Peruíbe-SP. Figura B: Pontos de coleta na região de Cananéia-SP. Fonte: Google Earth.

3.1.2 Isolamento de fungos filamentosos

Em um volume de 45 mL de solução salina (0,85%) com polisorbato 80 (0,01%), foram adicionados 10 g de sedimento. A mistura foi mantida em agitação constante de 100 rpm em uma plataforma agitadora por 1 h a temperatura de 25 °C. Findado este período, a suspensão resultante foi filtrada a vácuo utilizando papel filtro qualitativo (45 µm) e, posteriormente, diluída em série (10-9). Feito isso, foi inoculado 20 µL de cada diluição em placas de Petri contendo ágar batata dextrose e incubado a 30 °C por um período de sete dias. Após este intervalo, as colônias morfológicamente distintas a nível macroscópico foram sub cultivadas e incubadas com as mesmas condições para obtenção de culturas puras individuais. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.2 Identificação morfológica e molecular

A identificação morfológica dos fungos filamentosos foi feita a partir da observação de características das colônias, principalmente, por meio da observação das estruturas reprodutivas, os conidióforos, sendo realizada em duas etapas. Primeiro por meio da observação e anotação das características macroscópicas e, posteriormente, foi empregado a técnica de microcultivo a fim de observar as características morfológicas a nível microscópico (Alcântara, 2001; WINN Jr, et al. 2005).

Na identificação macroscópica dos fungos, foram considerados atributos descritos por Winn (2005), tais como o formato da colônia, a pigmentação da superfície e do reverso, bem como das regiões central e periférica, além de características como textura e produção de esporos.

Para a técnica de microcultivo, o fungo isolado foi cultivado em pequenas porções de ágar (BDA), de formato quadrado com aproximadamente 15 mm e alocado entre uma lâmina e lamínula, fixados em uma placa de Petri contendo algodão hidrofílico e regado com 3 ml de água para manter umidade. Depois de montar e inocular, o fungo foi incubado a 28°C por 24 a 72 horas, a fim de obter um crescimento mínimo de hifas, estruturas reprodutivas e pouca produção de esporos para não dificultar a visualização no microscópio. Após período de incubação, a lamínula foi retirada, corada com azul de algodão para realizar a observação no microscópio utilizando chave de identificação (GUARRO, 2012).

3.2.1 Crescimento Fúngico

As linhagens fúngicas foram cultivadas com o objetivo de obtenção do secretoma para ensaios de atividade biológica, utilizando duas abordagens distintas. Na primeira, o secretoma foi obtido a partir do cultivo fúngico em meio enriquecido (MGLP). Na segunda, a biomassa fúngica foi submetida a uma condição de estresse em meio aquoso antes da extração. Em ambos os casos, os fungos foram inicialmente reativados a partir da técnica de preservação em placas de BDA, sendo cultivados por 7 dias. Posteriormente, os inóculos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio MGLP (lipopolissacarídeo de metilglicose micobacteriano), preparado com glicose ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de malte ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e peptona bacteriológica ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A incubação foi conduzida por 7 dias a 30°C , sob agitação constante a 150 rpm. Após esse período, o cultivo destinado à obtenção direta do secretoma em meio enriquecido foi imediatamente processado para extração das frações desejadas. De maneira distinta, para a abordagem em meio aquoso, a biomassa foi lavada com água destilada e transferida para novos frascos Erlenmeyer contendo uma proporção de 1:10 de g/mL de biomassa por água destilada (Guilger-Casagrande, 2019). Os fungos foram então incubados por mais 3 dias nas mesmas condições, e, em seguida, o secretoma foi coletado e processado.

3.2.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA apenas as linhagens fúngicas denominadas de: AQ3A, AQ2A, MQ2A e MQ1C foram escolhidas. Cerca de 0,05 g de material fúngico crescido no meio líquido MGLP foi utilizado para realizar a extração do DNA. Os fungos foram colocados em microtubo contendo 100 μL EAR buffer (TRIS/HCl: 100mM, pH 8,5; EDTA: 5mM, pH 8,0; NaCl 200mM e 0,2% SDS) e 8 μL proteinase K ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Cada amostra foi incubada a 55°C sob agitação de 300 rpm overnight. Na sequência, a amostra foi aquecida por 10 min para inativar a proteinase K e, com auxílio de esferas de vidro, centrifugada a 4.260 rpm por 1 minuto de 3 ciclos com intervalo de 1 minuto. Após esta etapa, 500 μL de tampão TE (TRIS/HCl: 10 mM, pH 7,5 e EDTA: 1 mM) e 5 μL de RNase A ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram adicionados e incubados por mais 10 min a 37°C . A amostra de DNA genômico foi armazenada a -20°C para seguir com os procedimentos posteriores.

3.2.3 Reação de PCR

A escolha dos primers e a programação do termociclador seguiram as recomendações de Raja et al. (2017). Para a reação de PCR, foi utilizada a seguinte composição: 12,5 µL de Master Mix 2x, 1,25 µL (10 µM) do primer forward (ITS1, ITS1F ou ITS5), 1,25 µL (10 µM) do primer reverse (ITS4), 8 µL de água Milli-Q deionizada e 2 µL da amostra, totalizando um volume final de 25 µL.

A programação do termociclador consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de: 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 52 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 1 minuto (extensão). Ao final, foi realizada uma extensão final a 72 °C por 8 minutos. Após a PCR, as amostras foram armazenadas a -20 °C e posteriormente analisadas por eletroforese.

Entretanto, as amostras codificadas como AQ2A e AQ3A não apresentaram amplificação sob essas condições. Diante disso, conforme sugerido por Raja et al. (2017), a temperatura de anelamento foi reduzida de 52 °C para 48 °C, o que permitiu a obtenção de produtos amplificados.

3.2.4 Sequenciamento e identificação das espécies fúngicas

Os fragmentos de DNA obtidos foram encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco, pertencente ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para geração dos dados de sequência de bases. Em seguida, as sequências foram comparadas e analisadas contra o banco de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando o programa BLAST, concomitante com os bancos de dados do Mycobank e BOLDSYSTEMS.

3.3 Preparação do extrato protéico e peptídico do secretoma fúngico

Após o crescimento dos fungos e a obtenção do secretoma, tanto em meio aquoso quanto em meio enriquecido, o material foi processado para a separação das frações de interesse. Para esse fim, utilizou-se filtros de 10 kDa, com centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos. O material retido nos filtros foi considerado como fração proteica, enquanto o material permeado (<10 kDa) foi classificado como fração peptídica.

Em seguida, a quantificação de proteínas foi realizada utilizando o ensaio Quick Start™ Bradford Protein Assay, com curva padrão obtida a partir de albumina bovina (BSA) em diferentes diluições. De forma distinta, os peptídeos foram quantificados por espectrofotometria no NanoDrop One UV/VIS (Thermo Scientific). Para estimar a concentração peptídica, foi

utilizada uma curva padrão composta por peptídeos de tamanho e concentração conhecidos, com leituras realizadas no comprimento de onda de 214 nm.

3.4 Testes de atividade biológica

3.4.1 Atividade Antibacteriana- Teste de sensibilidade a antibacteriano com método de disco-difusão

Para avaliar a atividade antimicrobiana, foi utilizado o teste de sensibilidade pelo método de disco-difusão (M, Sejas *et al*, 2003). As cepas empregadas no estudo foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, todas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC).

Inicialmente, as cepas foram reativadas por meio da técnica de esgotamento em ágar Mueller-Hinton e incubadas overnight a 37°C. Após o período de incubação, as bactérias foram diluídas em 3 mL de solução salina, e a turbidez foi ajustada em espectrofotômetro, seguindo a escala de McFarland, até atingir uma densidade óptica (DO) de 0,5 a 600 nm.

Em seguida, as suspensões bacterianas foram plaqueadas em ágar Mueller-Hinton utilizando um swab estéril. Após a inoculação, foram afixados quatro discos de papel-filtro (~0,5 cm de diâmetro), sobre os quais foram pipetadas diferentes concentrações dos extratos proteicos. Os extratos testados foram obtidos das cepas fúngicas AQ3A, MQ2A e AQ2A, e utilizado 10, 20, 40 e 80 µg de proteína.

Posteriormente, realizou-se um novo ensaio confirmatório com a cepa que apresentou halo de inibição. Após a confirmação, conduziu-se um novo teste explorando concentrações maiores de extrato proteico, com 100 e 200 µg de proteína. Além disso, foram avaliados os extratos peptídicos das cepas MQ2A e AQ3A, nas concentrações de 40 µg e 20 µg de peptídeo, respectivamente. O fungo MQ2A foi selecionado para o teste com extrato peptídico devido à sua maior atividade antimicrobiana dentre os testados no ensaio com extrato >10kDa. Por outro lado, o AQ3A foi escolhido por ter sido o único a produzir quantidades significativas de peptídeos no secretoma em H₂O.

3.4.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por meio de um ensaio de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços. Inicialmente, as bactérias reativadas em ágar Mueller-Hinton foram diluídas em 3 mL de meio líquido TSB (Tryptic Soy Broth), e a

densidade óptica foi ajustada para 0,5 a 600 nm no espectrofotômetro. Em seguida, o extrato >10kDa do fungo MQ2A foi preparado nas concentrações de 40 µg, 80 µg, 100 µg e 200 µg. O volume final de cada poço foi de 200 µL, composto por 140 µL do inóculo bacteriano diluído no meio e 60 µL da amostra e solução salina. Quando necessário, a amostra foi homogeneizada em solução salina 0,9% para atingir o volume necessário. A preparação das diluições dos extratos está representada na Tabela 1.

Para a montagem da placa, além dos extratos, foram incluídos os seguintes controles: padrão branco, contendo 200 µL de meio TSB; controle positivo, composto por 140 µL do inóculo e 60 µL de solução salina; e controle negativo, contendo 140 µL do inóculo, 20 µL de ampicilina e 40 µL de solução salina. Após a montagem, a placa foi incubada a 37°C por 24 horas. Após o término do período de incubação, 10 µL de cada poço foram inoculados em placas de ágar Mueller-Hinton para avaliar a atividade bactericida. Sendo assim, a concentração na qual não houve crescimento bacteriano após o plaqueamento em ágar, foi considerada como um indicativo de possível ação bactericida.

Tabela 1: Tabela de diluição dos extratos >10kDa

Amostra	Quantidade de proteína requerida para o teste (µg)	Volume de extrato utilizado (µL)	Volume de solução salina utilizada (µL)	Volume final (µL)
MQ2A	40	12	48	60
MQ2A	80	24	36	60
MQ2A	100	30,3	29,7	60
MQ2A	200	60,6	0	60,6

3.4.3 Determinação de capacidade antioxidante pelo método com DPPH

A atividade antioxidante, expressa como atividade sequestrante do radical DPPH, foi determinada de acordo com o método descrito por Ahmad et al. (2012). A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada em termos de doação de hidrogênio ou sequestro de radicais livres, utilizando o radical estável DPPH.

Para a análise da atividade antioxidante, em uma placa de 96 poços, foi pipetado 190 µL da solução de DPPH e 10 µL de amostra. Feito isso, a placa foi incubada no escuro por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância da solução foi medida a 515 nm. A redução da absorbância após a leitura é inversamente proporcional à atividade sequestrante de

radicais livres. Todos os testes foram realizados em triplicata. A atividade sequestrante de radicais foi expressa como a porcentagem de descoloração do DPPH, calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição de radicais DPPH} = 100 * (1 - \text{ABSM} / \text{ABSC})$$

Onde: ABSM representa a absorbância média da solução de DPPH e ABSC representa a absorbância média do controle.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento de fungos filamentosos

A diluição seriada das amostras de sedimento, seguida de cultivo e subcultivo, resultou no isolamento de oito cepas fúngicas. As linhagens isoladas foram denominadas: MQ1A, MQ1B, MQ1C, MQ2A, AQ2A, AQ3A, C4 e CB2 (Figura 3).

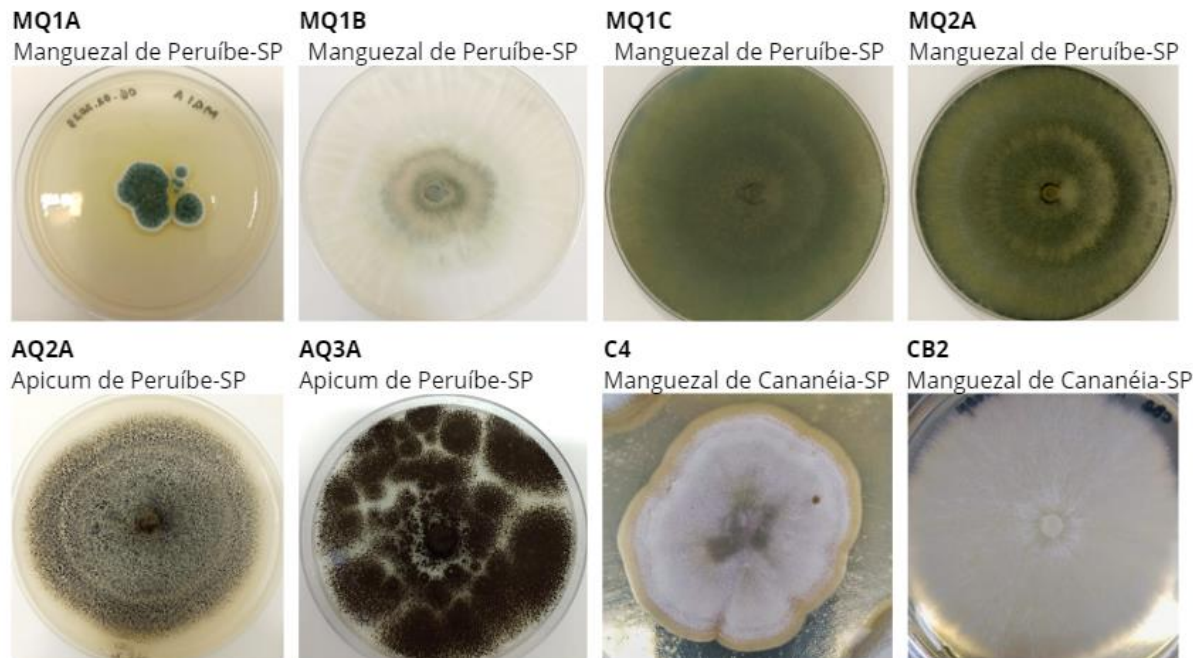


Figura 3: Aspecto macroscópico dos fungos isolados e crescidos em BDA.

4.2 Identificação morfológica

A primeira etapa da identificação consistiu em distinguir e caracterizar as cepas com base em aspectos morfológicos. Posteriormente, utilizou-se a técnica de microcultivo, figura 4, para examinar as estruturas microscópicas, buscando identificar os fungos em seu nível taxonômico mais baixo. Foram considerados fatores como pigmentação, tipo de borda, textura, quantidade de esporos, tipo de hifa, e a morfologia dos conidióforos e conídios (Tabela 2).

As cepas AQ2A, AQ3A, MQ1C e MQ2A passaram por uma descrição morfológica básica, fundamentada na literatura, abordando tanto características macros quanto micro morfológicas, com o objetivo de correlacionar esses dados à identificação molecular.

AQ2A: Quando cultivada em BDA, a cepa apresenta pigmentação preta, bordas brancas e textura arenosa, com relevo apiculado. Os conidióforos têm estruturas alongadas, de paredes lisas e translúcidas, com coloração mais escura próxima à vesícula. As cabeças conidiais são esféricas, radiadas e de coloração negra, compostas por fiálides bisseriadas, assemelhando-se às características descritas para *Aspergillus tubingensis* (BLEICHRODT et al., 2013).

AQ3A: Em BDA, as colônias iniciam brancas e rapidamente tornam-se pretas, com produção de conídios furfuráceos. O reverso é amarelo pálido e o crescimento pode gerar fissuras radiais no ágar. As hifas são septadas e hialinas. As cabeças dos conídios são pretas, radiadas, e tendem a se dividir em colunas soltas quando maduras. Os conídios são globosos a subglobosos, de cor marrom, com verrugas, espinhos ou cristas irregulares. Os conidióforos são longos, de paredes lisas, hialinos, escurecendo no ápice e terminando em uma vesícula globosa a subglobosa (MANGAL, 2014). Embora a classificação seja difícil, as características do AQ3A são muito semelhantes às dos fungos da seção *Aspergillus nigri*.

MQ2A: Apresenta conidióforos típicos da seção Trichoderma, com disposição verticilada regular, formando uma estrutura piramidal. As fiálides variam de ampuliformes a lageniformes, geralmente em número de 3 a 4, ocasionalmente emparelhadas. Os conídios são sub-globosos ou ovóides, geralmente lisos e sub-hialinos, ou com uma coloração verde pálida a qual não é possível visualizar nas fotos devido ao corante azul de algodão (W. Gams & W. Meyer, 1998). Macroscopicamente, nota-se uma forma difusa de conídios, com aparência granulosa ou pulverulenta devido à alta densidade de conídios, que rapidamente adquirem coloração verde-escura, com bordas estéreis brancas, especialmente no início do crescimento.

MQ1C: Em BDA, as colônias apresentam coloração cinza-esverdeada, com textura furfurácea e pulverulenta. Micro Morfologicamente, os conidióforos são característicos do gênero *Aspergillus*, contendo conidióforos unisseriados, cabeças conidiais colunares, vesículas em formato de frasco com fiálides cobrindo de metade a três quartos da vesícula, e conídios globosos, alguns com rugosidade leve e de coloração verde uniforme, que não é perceptível na figura 4 devido ao uso do corante e é marcante na espécie *Aspergillus fumigatus*(González-Ramírez, 2016).

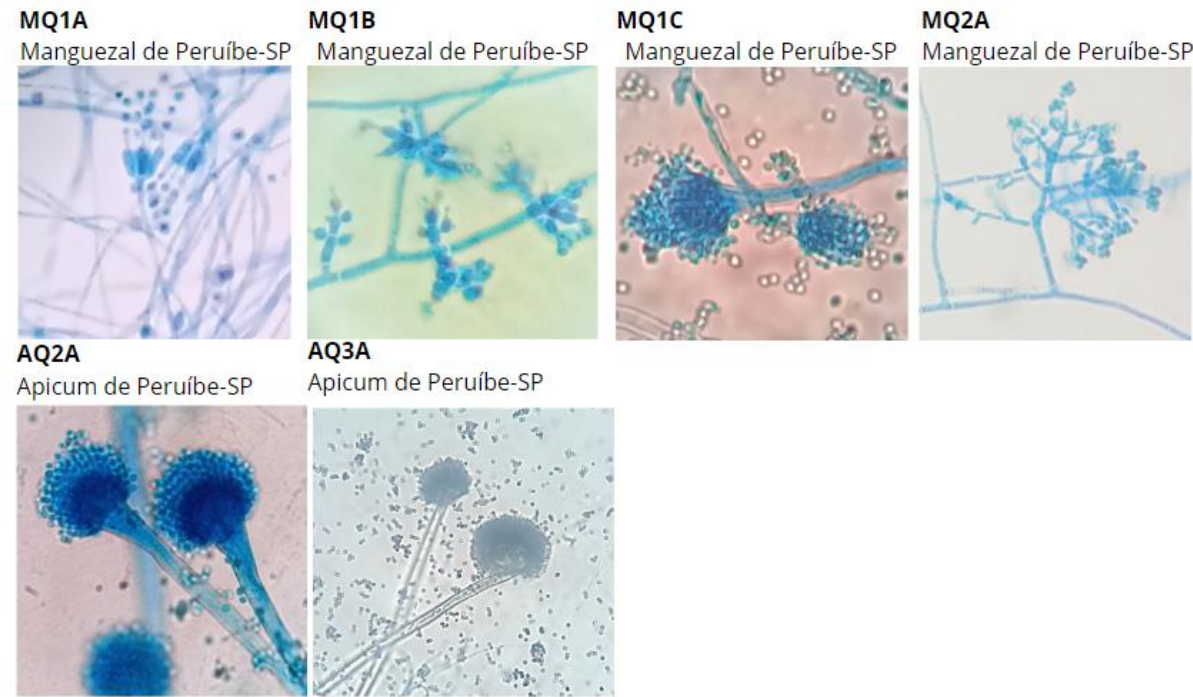


Figura 4: Fotos da micromorfologia das estruturas reprodutivas dos fungos corados com azul de algodão.

Tabela 2: Classificação dos fungos a partir das características morfológicas

	Pigmento	Borda	Textura	Relevo	Esporulante	Tipo de hifa	Conidióforo	Conídio
MQ1A	Verde-azulado	Branca	Velutínea	Apiculado	Não	Hialina e septada	Alongados e grossos (pincel)	Alongado
MQ1B	Verde	Branca	Algodonosa	Apiculado	Não	Hialina e septada	Espirilados em 90°	Globoso
MQ1C	Verde-azulado	Branca	Furfurácea	Apiculado	Sim	Hialina e septada	Alongados e piriforme (aspersório)	Globoso e finamente rugoso
MQ2A	Verde	Branca	pulverulento	Apiculado	Não	Hialina e septada	verticilados e piramidal	Subgloboso e obovóide

AQ2A	Preto	Branca	Arenosa	Apiculado	Sim	Hialina e septada	Alongados e piriforme (aspersório)	Globoso
AQ3A	Marrom-preto	Branca	Furfurácea	Apiculado	Sim	Hialina e septada	Alongados e piriforme (aspersório)	Globoso e sub globoso
C4	Rosado	Branca	Velutínea	Apiculado	Não	Hialina e septada		
CB2	Branco	Lisa	Algodonosa	Apiculado	Não	Hialina e septada		

4.3 Identificação molecular:

4.3.1 Extração de DNA e PCR

Das cepas isoladas, quatro foram selecionadas para identificação molecular: AQ2A, AQ3A, MQ2A e MQ1C. O DNA genômico dessas linhagens foi extraído, amplificado por PCR utilizando primers específicos para a região ITS, e os produtos de amplificação foram confirmados por meio de eletroforese em gel, como demonstrado nas figuras 5 e 6. Observou-se que o desempenho dos primers variou entre as cepas. O primer ITS1 apresentou melhor desempenho nas amostras MQ2A e MQ1C, enquanto o primer ITS1F foi mais eficaz nas cepas AQ2A e AQ3A. Além disso, a amplificação das amostras AQ2A e AQ3A só foi obtida com a redução da temperatura de anelamento de 52 °C para 48 °C.

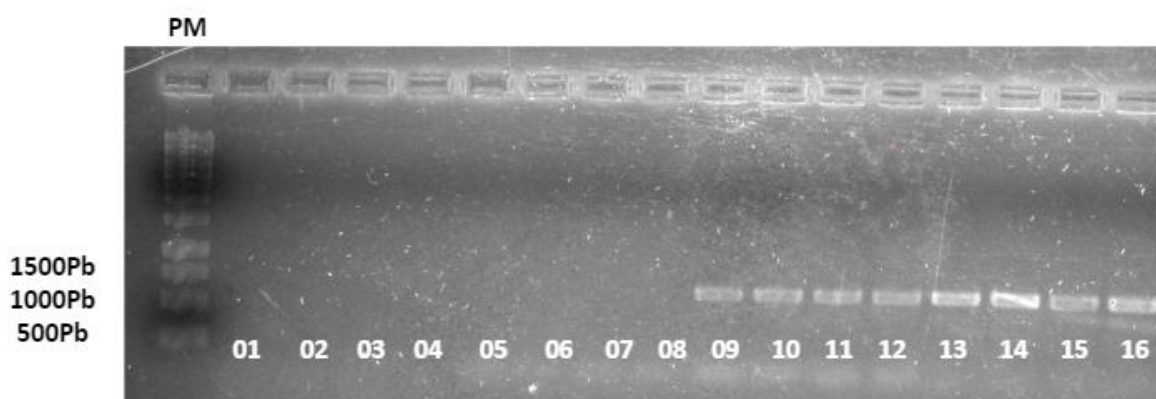


Figura 5: Gel de agarose 2% dos amplificados utilizando ITS1(forward) e ITS4 (reverse) com a temperatura de anelamento de 52°C. Os poços ímpares correspondem ao ITS1 e os pares ITS4. O gel foi realizado em duplicata. Do 01 ao 04 refere-se ao AQ3A. Do 05 ao 08 está presente a cepa do AQ2A. Os números de 09 a 12 correspondem ao fungo MQ2A. O restante equivale ao MQ1C. **PM**= peso molecular.

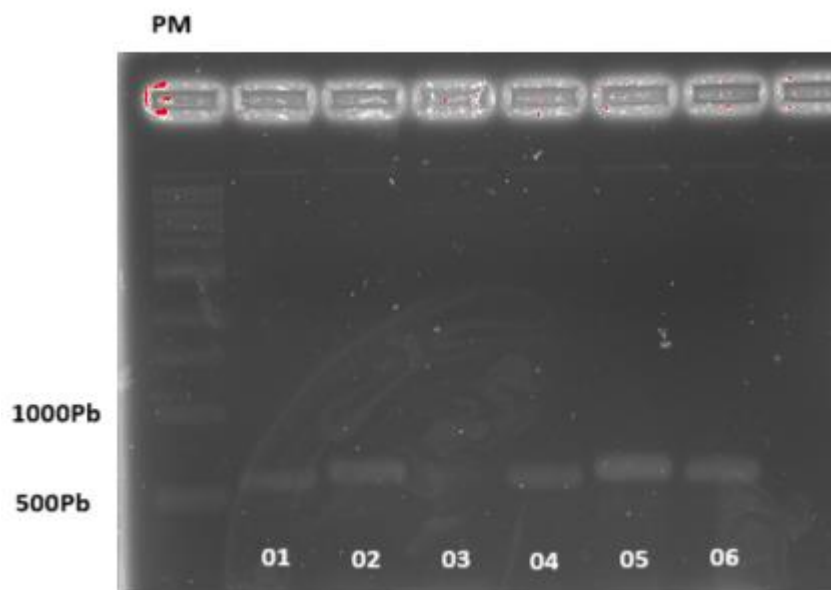


Figura 6: Gel de agarose 2% das cepas do AQ3A e AQ2A com ITS1F, ITS5 e ITS1 com temperatura de anelamento de 48°C. Conteúdo dos poços enumerados: 01 ao 03 amostras de AQ3A, contendo ITS5, ITS1F e ITS1 respectivamente. Do 04 ao 06 são correspondentes ao AQ2A seguindo a mesma ordem dos primers anteriores. **PM**= peso molecular.

4.3.2 Sequenciamento e identificação das espécies fúngicas

Os resultados brutos do sequenciamento de DNA, apresentados no material suplementar, foram utilizados para realizar o alinhamento com bancos de dados disponíveis. Para isso, foram empregados três repositórios para possibilitar comparações: BLAST-NCBI, MycoBank e BOLDSYSTEMS. Após as análises, os resultados foram listados na tabela 3. Segundo a tabela, as espécies que apresentaram maior consistência entre os bancos foram os isolados MQ2A e MQ1C, identificados como *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente, ambos com média de similaridade superior a 99% e valor de E igual a zero.

Apesar de o banco NCBI apresentar divergência na identificação do isolado MQ2A em relação aos demais, a literatura aponta que *Trichoderma harzianum* é um grupo complexo, do qual o *Trichoderma rifaii* também faz parte, indicando a proximidade filogenética entre eles. Por conta desta complexidade, este grupo ainda apresenta incertezas taxonômicas, com sua classificação permanecendo em discussão (GAMS; MEYER, 1998; Chaverri, P. et al. 2015).

Por outro lado, os isolados AQ2A e AQ3A não apresentaram resultados tão consistentes entre os três bancos de dados. A literatura registra a descrição de novas espécies dentro desse grupo, além da aplicação de métodos polifásicos, que, ainda assim, enfrentam dificuldades na delimitação e identificação taxonômica. Esses dados reforçam a complexidade sistemática do

grupo (SILVA et al., 2011; VARGA et al., 2011). No entanto, ao comparar as características macro e micromorfológicas descritas na literatura, observa-se semelhança entre o isolado AQ2A e *Aspergillus tubingensis*.

Tabela 3: Resultados do alinhamento de DNA nos bancos de dados NCBI Blast , Mycobank, BOLDSYSTEM. *Per Ident= percent identity

	Espécie	Total score	Max score	Query cover (%)	E-value	Per. Ident* (%)	Similaridade (%)	Sobreposição (%)	Base de dados
MQ2A (ITS1)	<i>T. rifaii</i>	1014	1014	64	0.0	99.29			BLAST
	<i>T. harzianum</i>						100	62.83	Mycobank
	<i>T. harzianum</i>	554					98.95		BOLDSYSTEMS
MQ1C (ITS1)	<i>A. fumigatus</i>	1090	1090	96	0.0	99.34			BLAST
	<i>A. fumigatus</i>						100	91	Mycobank
	<i>A. fumigatus</i>	586			0		98.84		BOLDSYSTEMS
AQ3A (ITS1F)	<i>A. costaricensis</i>	1062	1062	97	0.0	99.32			BLAST
	<i>A. tubingensis</i>	908.91					99.83	94.53	Mycobank
	<i>A. tubingensis</i>	576			0		99.66		BOLDSYSTEMS
AQ2A (ITS1F)	<i>A. costaricensis</i>	1070	1070	96	0.0	99.66			BLAST
	<i>A. costaricensis</i>	907.31					100	94.20	Mycobank
	<i>A. tubingensis</i>	580					99.83		BOLDSYSTEMS

4.4 Preparo do secretoma

4.4.1 Dosagem de proteínas e peptídeos do secretoma

Os fungos foram cultivados em meio MGLP por 7 dias, sob agitação constante de 150 rpm e temperatura de 30°C. Ao término do período, a biomassa fúngica foi filtrada a vácuo utilizando um filtro Millipore de 45 µm e, em seguida, lavada com água destilada. Após a separação da biomassa e a remoção de resíduos do meio enriquecido, os fungos foram inoculados em água destilada na proporção de 10:1 (mL/g), ou seja, 10 mL de água por grama de biomassa, por um período de 72 horas. Após esse período, a biomassa foi separada do

secretoma e o conteúdo total de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford. De acordo com os resultados apresentados na tabela 4, a cepa MQ2A exibiu o maior teor de proteínas totais com cerca de 3.3µg/µl, enquanto MQ1C apresentou baixo rendimento, impossibilitando a estimativa pelo método de Bradford. Essa limitação também pode estar associada à presença de polissacarídeos, material mucilaginoso, sais e metabólitos secundários secretados, como ácidos orgânicos de baixo peso molecular, ácidos graxos, fenóis, quinonas e outros compostos aromáticos (FERNÁNDEZ, R, 2013).

A quantificação de peptídeos por espectrofotometria UV/Vis utilizando o equipamento Nanodrop One gerou os dados apresentados na tabela 5. Dentre as amostras analisadas, apenas as intracelulares apresentaram leituras detectáveis. As amostras extracelulares, em meio de água destilada, não puderam ser quantificadas, possivelmente devido à baixa concentração de peptídeos ou presença de interferentes que comprometeram a detecção. Notavelmente, a cepa AQ3A foi a única que apresentou detecção no meio extracelular, sendo a única a ser possível quantificar os peptídeos extracelulares. Ainda assim, seu rendimento foi significativamente inferior quando comparado ao teor total de peptídeos intracelulares. Cerca de 1,439 µg/µl nas amostras intracelulares e 0,536 µg/µl de concentração no secretoma em H₂O.

Tabela 4: Concentração de proteína dos extratos >10kDa medida por absorbância em espectrofotômetro

Fungo	Resultado ajustado(µg/µl)
AQ2A	1,92
AQ3A	1,88
MQ2A	3,3
MQ1C	0,0

Tabela 5: Concentrações de peptídeos após dosagem com *Nanodrop One* microvolume UV/Vis.

Fungo_peptídeo intracelular	Concentração (µg/µl)
AQ2A	0,961
AQ3A	1,439
MQ2A	0,396
MQ1C	1,230
Fungo_peptídeo extracelular	
AQ3A	0,536

Após os ensaios antibacterianos, o fungo que se mostrou mais promissor foi o isolado MQ2A. Por este motivo foi necessário obter e dosar mais proteínas do seu secretoma a fim de prosseguir com as análises. Como resultado da segunda dosagem segue a tabela 6.

Tabela 6: Dosagem por Bradford para estimar as concentrações de proteínas totais do secretoma em MGLP e H₂O do isolado MQ2A

Amostras_MQ2A	ajuste diluição µg/µl
MGLP 1:10	3,86
MGLP1:20	3,76
MGLP 1:10	3,52
MGLP 1:20	4,08
H ₂ O 1:10	2,07
H ₂ O 1:5	1,71
H ₂ O 1:10	1,98
H ₂ O 1:5	1,68

4.5 Testes de atividade biológica

4.5.1 Atividade Antibacteriana - Teste de sensibilidade a antibacteriano com método de disco-difusão

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado utilizando a fração proteica do secretoma em H₂O, obtida após filtração em membrana de 10 kDa. O material retido no filtro foi coletado e empregado nos testes. No primeiro ensaio, foram avaliadas as cepas MQ2A, AQ2A e AQ3A.

Após a quantificação proteica pelo método de Bradford, foram separadas alíquotas contendo 10, 20, 40 e 80 µg de proteína para a realização dos testes. Como ilustrado na Figura 7, foi possível observar halos de inibição para a cepa MQ2A, evidenciando atividade antimicrobiana.

Os resultados indicaram maior inibição entre as bactérias Gram-positivas, que apresentaram halos de maior diâmetro, aproximadamente 1,5 cm, tanto nas concentrações mais elevadas quanto nas mais baixas. Em contraste, bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, não apresentaram halos nas concentrações de 10 e 20 µg, com apenas leve atividade detectada a 40 µg. Halos de inibição mais evidentes para essas bactérias foram observados apenas na maior concentração testada, de 80 µg.

Após o primeiro teste, a cepa MQ2A foi selecionada para continuidade da triagem. Inicialmente, o ensaio foi repetido nas mesmas condições para confirmar os resultados anteriores, conforme demonstrado na figura 8. Em seguida, foram testadas concentrações maiores do extrato proteico do secretoma, de 100 µg e 200 µg e o resultados foram demonstrados na figura 9. A repetição do ensaio com as concentrações anteriores confirmou os resultados obtidos inicialmente, reforçando o potencial antimicrobiano da cepa. No terceiro teste, com as quantidades ampliadas de 100 µg e 200 µg, o mesmo padrão de inibição foi observado. As bactérias *Staphylococcus* Gram-positivas mantiveram maior halo de inibição, com aproximadamente 2 cm na maior concentração testada. Já as bactérias Gram-negativas apresentaram halos menores. Dentre eles, *Escherichia coli* foi a mais suscetível, com um halo de inibição de pouco mais de 1,5 cm com 200 µg de extrato, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* formou um halo de aproximadamente 1,3 cm sob as mesmas condições.

A fração peptídica (<10 kDa) não demonstrou atividade significativa nos testes com os extratos das cepas AQ3A e MQ2A, como ilustrado na Figura 10.

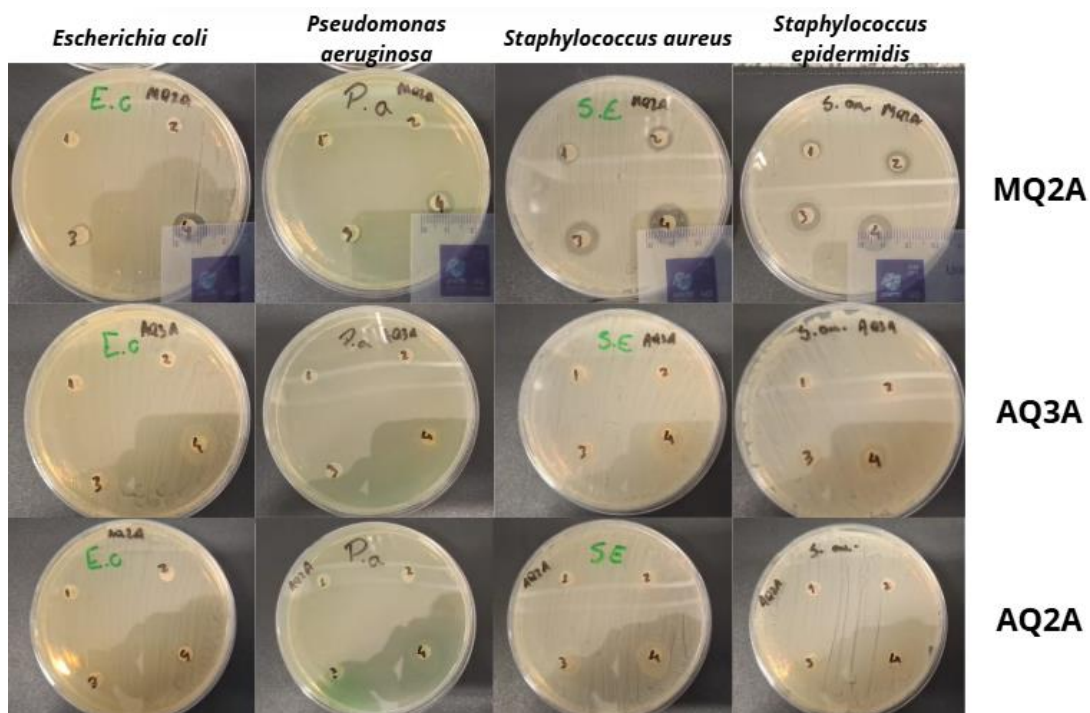


Figura 7: 1º teste antimicrobiano método disco-difusão com extrato protéico das cepas fúngicas

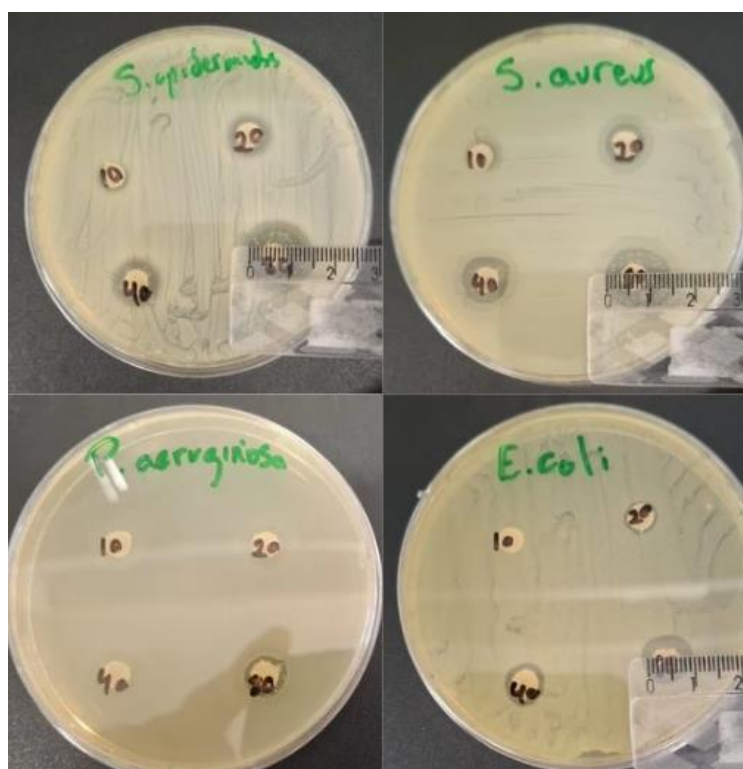


Figura 8: 2º Teste antimicrobiano com cepa MQ2A. Na parte superior, da esquerda para direita: *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Na parte inferior da esquerda para direita: *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

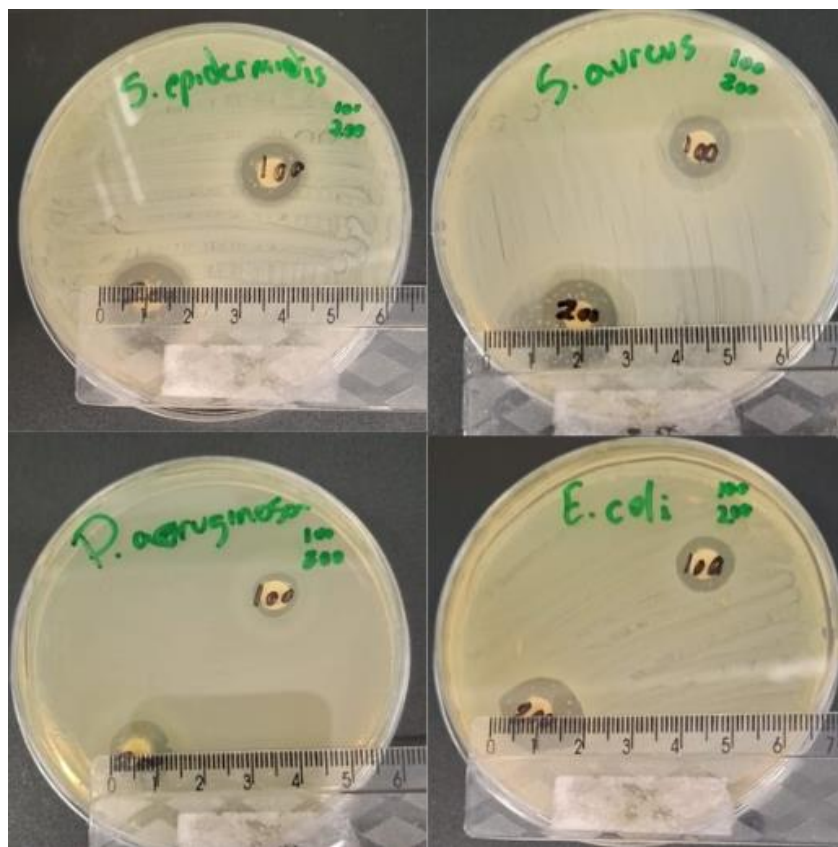


Figura 9: 3º Teste antimicrobiano com cepa MQ2A com 100µg e 200µg de extrato protéico. Na parte superior da esquerda para direita: *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Na parte inferior da esquerda para direita: *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

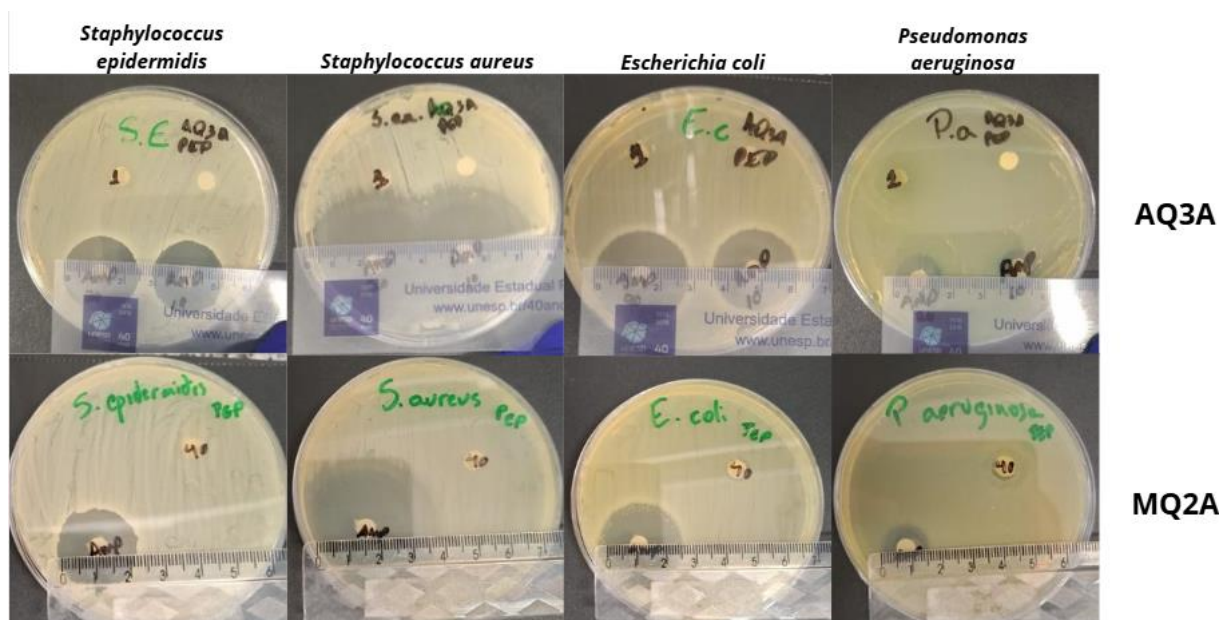


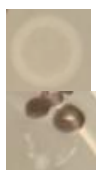
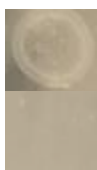
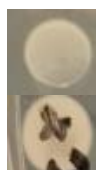
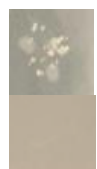
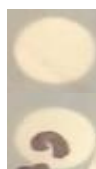
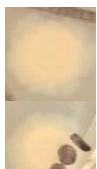
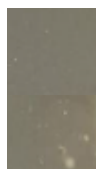
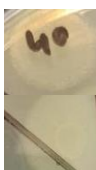
Figura 10: Teste com peptídeo do MQ2A e AQ3A. MQ2A foi usado 40µg de extrato e AQ3A 20µg

4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC) com resazurina

O teste foi conduzido com o secretoma da cepa MQ2A, especificamente com a fração retida (>10 kDa) no filtro utilizado e ilustrado na tabela 6. Os resultados obtidos corroboram os achados do primeiro ensaio antimicrobiano. As bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, demonstraram maior sensibilidade ao extrato, uma vez que ambas reagiram à maioria das concentrações testadas. Notavelmente, *S. aureus* apresentou sensibilidade em todas as concentrações, exibindo crescimento reduzido em baixas concentrações de extrato quando comparado ao controle positivo.

Por outro lado, as bactérias gram-negativas testadas não apresentaram efeito bactericida, visto que as bactérias mantiveram sua capacidade de crescimento, conforme evidenciado pelo plaqueamento bacteriano após a inoculação com o extrato.

Tabela 6: Resultado do ensaio de MIC após plaqueamento das bactérias expostas aos extratos

	40µg	80µg	100µg	200µg	Amp	C+
<i>S.aureus</i>						
<i>S.epidermidis</i>						
<i>E.coli</i>						
<i>P.aeruginosa</i>						

>10kDa

4.5.3 Determinação de capacidade antioxidante pelo método com DPPH

A atividade antioxidante dos extratos de MQ2A e AQ2A foi avaliada utilizando o ensaio de sequestro do radical DPPH, tendo a quercetina como padrão. A curva de calibração foi construída com concentrações de 80 μ M a 0,15 μ M de quercetina em uma redução progressiva para evidenciar a diminuição da absorbância conforme o aumento da concentração do antioxidante.

Os extratos utilizados no ensaio foram a fração do secretoma retidas no filtro de 10kDa. Os resultados, como ilustrado na figura 11, demonstraram que nenhum dos extratos testados apresentou atividade antioxidante significativa, uma vez que as leituras de absorbância não indicaram redução efetiva do radical DPPH quando comparadas com a curva da quercetina. Assim, sugere-se que os compostos presentes nos extratos fúngicos, na forma obtida, não possuem uma atividade antioxidante significativa dentro das condições experimentais testadas.

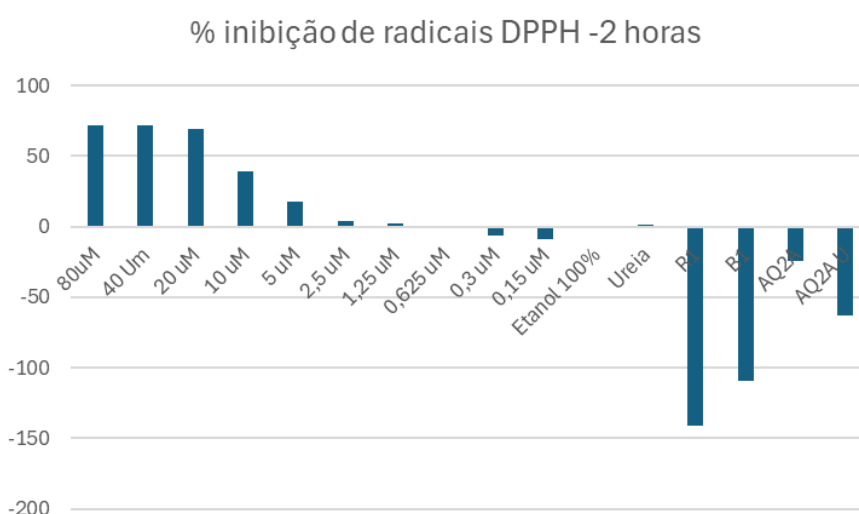


Figura 11: Resultado do ensaio antioxidante com radical DPPH e curva de antioxidante com Quercetina.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar fungos filamentosos presentes nos sedimentos de manguezais do litoral paulista, uma região ainda pouco explorada sob essa perspectiva, apesar de ser constantemente ameaçada e abrigar grupos microbianos de reconhecida importância ecológica, como já mencionado (Brito M, *et al* 2025). Além disso, foi explorado o potencial biotecnológico das cepas isoladas dos sedimentos e realizado

bioprospecção de compostos proteicos com atividade biológica e antibacteriana. A partir da caracterização molecular e morfológica foi possível identificar a presença de dois grandes gêneros: *Trichoderma* e *Aspergillus*, os quais já são amplamente reconhecidos pela capacidade de produzir metabólitos secundários de interesse farmacológico e grande potencial biotecnológico (VILLAO-UZHO, et al. 2024; Cairns, et al. 2018).

A identificação molecular de fungos, especialmente de espécies pertencentes à seção *Nigri* do gênero *Aspergillus* e ao complexo *Trichoderma harzianum*, como é o caso dos isolados AQ2A, AQ3A e MQ2A, apresenta desafios bem documentados na literatura. Diversos estudos indicam a presença de espécies crípticas nesses grupos, além de sinônimos taxonômicos e inconsistências recorrentes nos principais bancos de dados genéticos. Tais dificuldades são frequentemente relatadas tanto para espécies de *Trichoderma* (Ismaiel et al., 2024; Chaverri et al., 2015; Gams & Meyer, 1998) quanto para o gênero *Aspergillus* (Elizabet et al., 2018; Perrone et al., 2011), refletindo a complexidade sistemática desses táxons e a necessidade de novas abordagens e padronizações para uma identificação mais precisa.

Dentre os isolados, a cepa MQ2A, identificada como pertencente ao complexo *Trichoderma harzianum*, destacou-se pelos resultados positivos nos ensaios de atividade antibacteriana. Os testes de disco-difusão revelaram maior suscetibilidade de bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, frente ao extrato proteico do secretoma, indicando a presença de substâncias com possível ação bactericida. Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) reforçam essa observação, uma vez que, em concentrações crescentes, observou-se a inibição do crescimento bacteriano, principalmente nas cepas gram-positivas.

Por outro lado, as bactérias gram-negativas demonstraram maior resistência ao extrato testado, o que pode estar relacionado à barreira estrutural conferida pela dupla membrana lipopolissacarídica típica dessas bactérias, dificultando a penetração de compostos bioativos, ou mesmo outros mecanismos de resistência comum ao grupo (Wanda C, 2018; Severn MM & Horswill AR, 2023).

Nesse contexto, vale destacar que diversos estudos na literatura relatam compostos proteicos produzidos por fungos, especialmente ascomicetos, com potencial antibacteriano (Li, Zheng & Zhou, 2019; Ramachander Turaga, 2020; Falah et al., 2023; Datta, Rajeev & Chattopadhyay, 2023; Abouamama, Sidaoui et al, 2023). Muitos desses compostos estão documentados em faixas de massa molecular próximas ou superiores a 10 kDa como testado no trabalho. Exemplos incluem ribonucleases com cerca de 12 kDa, endolisinas monoméricas de aproximadamente 17 kDa e dímeros com massas em torno de 44 kDa, todos descritos com atividade antibacteriana, inclusive frente a cepas resistentes (Cheung et al., 2016; Al-Fakih &

Almaqtri, 2019). Além desses, há outros compostos proteicos fúngicos descritos com ações semelhantes dentro dessa faixa de peso molecular. Também é relevante considerar que peptídeos antimicrobianos, mesmo quando menores, podem formar agregados ou complexos funcionais que acabam sendo retidos em frações de maior massa aparente (T.B. Ng, 2004).

Além da atividade antimicrobiana, foi avaliada a capacidade antioxidante dos extratos utilizando o método com DPPH. Contudo, os resultados obtidos não demonstraram atividade antioxidante significativa nas condições experimentais testadas. Essa ausência de efeito pode estar relacionada à baixa concentração de compostos antioxidantes presentes nos extratos ou à instabilidade de certos metabólitos, como fenólicos e carotenoides, que são altamente sensíveis à luz e à presença de oxigênio (Santos-Sánchez et al., 2018).

Portanto, diante dos resultados antibacterianos positivos dos extratos na faixa de 10kDa, somado ao potencial descrito na literatura sobre os fungos filamentosos, algumas estratégias futuras serão adotadas. Técnicas de fracionamento das amostras como cromatografia, associados a resultados da espectrometria de massas, serão empregadas para caracterizar o conteúdo proteico do secretoma, bem como identificar a fração responsável pela atividade observada, possibilitando, isolar, identificar e, se possível caracterizar a estrutura e o mecanismo de ação do composto antibacteriano.

6.CONCLUSÃO

Ao demonstrar a capacidade de algumas cepas como *Trichoderma harzianum*, o isolado MQ2A, de produzir compostos com atividade antibacteriana, reforça a relevância desses microrganismos como fontes promissoras na busca por novos antimicrobianos e outros metabólitos de interesse farmacêutico. Essa abordagem torna-se ainda mais relevante diante da crescente ameaça representada pela resistência bacteriana, destacando a viabilidade e a importância de se explorar ecossistemas negligenciados como fontes naturais de moléculas bioativas.

Além disso, os resultados obtidos reforçam o valor estratégico da pesquisa em bioprospecção como ferramenta prática e sustentável para a descoberta de compostos com potencial terapêutico, ao mesmo tempo em que contribuem para a valorização e conservação de ambientes sensíveis e com microbiota pouco estudada como os manguezais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AL-FAKIH AA, ALMAQTRI WQA. Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. *Mycology*. 2019 Apr 22;10(4):191-209. doi: 10.1080/21501203.2019.1604576. PMID: 31632829; PMCID: PMC6781474.

ABOUAMAMA, SIDAOU I ET AL. Amylolytic and antibacterial activity of filamentous fungi isolated from the rhizosphere of different plants grown in the Tamanghasset region Heliyon. 2023 March, Volume 9, Issue 3, e14350

BARTHOLOMEW SAANU ADELEKE & OLUBUKOLA OLURANTI BABALOLA, 2021, Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review, *Journal of Fungi*, 7:147. [https://doi.org/ 10.3390/jof7020147](https://doi.org/10.3390/jof7020147)

BLEICHRODT, R., VINCK, A., KRIJGSHELD, P., VAN LEEUWEN, M. R., DIJKSTERHUIS, J. E WÖSTEN, H. A. B. (2012). Cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*, *Studies in Mycology*, 74, pp. 31–46.

BRITTO MARTINS DE OLIVEIRA, J.; CORRÊA JUNIOR, D.; PARENTE, C.E.T.; FRASES, S. Fungi in Mangrove: Ecological Importance, Climate Change Impacts, and the Role in Environmental Remediation. *Microorganisms* 2025, 13, 878. <https://doi.org/10.3390/microorganismS13040878>

CAIRNS, T.C., NAI, C. & MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol* 5, 13 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>

CHAVERRI, P. ET AL. (2015) ‘Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains’, *Mycologia*, 107(3), pp. 558–590. doi: 10.3852/14-147.

DATTA, MANJARI et al. “Application of antimicrobial peptides as next-generation therapeutics in the biomedical world.” *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 1-39. 10 Apr. 2023, doi:10.1080/02648725.2023.2199572

DAVIDE RIGHI, ROBIN HUBER, ALEXEY KOVAL, LAURENCE MARCOURT, SYLVAIN SCHNEE, ANAÏS LE FLOCH, VERENA DUCRET, REMO PEROZZO, CONCETTA C. DE RUVO, NICOLE LECOULTRE, EMILIE MICHELLOD, SAMAD N. EBRAHIMI, ELISABETH RIVARA-MINTEN, VLADIMIR L. KATANAEV, KARL

PERRON, JEAN-LUC WOLFENDER, KATIA GINDRO & EMERSON F. QUEIROZ, 2020, Generation of Stilbene Antimicrobials against Multiresistant Strains of *Staphylococcus aureus* through Biotransformation by the Enzymatic Secretome of *Botrytis cinerea*, Journal of Natural Products, 83:2347–2356, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00071>

ELIZABETE DE SOUZA CÂNDIDO, MICHELLE FLAVIANE SOARES PINTO, PATRÍCIA BARBOSA PELEGRINI, THAIS BERGAMIN LIMA, OSMAR NASCIMENTO SILVA, ROBERT POGUE, MARIA FÁTIMA GROSSI-DE-SÁ', & OCTAVIO LUIZ FRANCO, 2011, Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms, The FASEB Journal, 25:3290–3305, <https://doi.org/10.1096/fj.11-184291>

Elizabet D'hooge, Pierre Becker, Dirk Stubbe, Anne-Cécile Normand, Renaud Piarroux, Marijke Hendrickx, Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy?, Medical Mycology, Volume 57, Issue 6, August 2019, Pages 773–780, <https://doi.org/10.1093/mmy/myy124>

F.A. MOSCHETTO, R.B. RIBEIRO, D.M. DE FREITAS, Urban expansion, regeneration and socioenvironmental vulnerability in a mangrove ecosystem at the southeast coastal of São Paulo, Brazil, Ocean & Coastal Management, Volume 200, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2020.105418>.

FADIA FALAH HASSAN, RANA ALAA AL-AAMERY, & SHAYMAA SABAH MAHDI. (2023). A systematic review of Antimicrobial peptides and their current applications. Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology, 30(6), 337–343. <https://doi.org/10.47750/jptcp.2023.30.06.038>

FEHMIDA BIBI, IKRAM ULLAH, SANA AKHTAR1, MUHAMMAD YASIR, EMAN AHMED KENSARAH, AHMED ABDULLAH KHALAF AL-GHAMDI, ESAMI. AZHAR, 2017, Diversity and bioprospecting potential of rhizo and endophytic bacteria from two mangrove plants in Saudi Arabia, African Journal of Microbiology Research, 11(19): 29-739.

FERNÁNDEZ, R.G., NOVO, J.V.J. (2013). Proteomic Protocols for the Study of Filamentous Fungi. In: Gupta, V., Tuohy, M., Ayyachamy, M., Turner, K., O'Donovan, A. (eds) Laboratory Protocols in Fungal Biology. Fungal Biology. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_24

FRANCENIA SANTOS-SÁNCHEZ, N., SALAS-CORONADO, R., VILLANUEVA-CAÑONGO, C., & HERNÁNDEZ-CARLOS, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.85270

FRANCISCA ALCAYAGA-MIRANDA, JIMENA CUENCA & MAROUN KHOURY, 2017, Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies, the journal *Frontiers in Immunology* , 8:339. doi: 10.3389/fimmu.2017.00339

GAO, HAI et al. “Bioactive Metabolites From Acid-Tolerant Fungi in a Thai Mangrove Sediment.” *Frontiers in microbiology* vol. 11 609952. 22 Jan. 2021, doi:10.3389/fmicb.2020.609952

GIANCARLO PERRONE, GAETANO STEA, FILOMENA EPIFANI, JÁNOS VARGA, JENS C. FRISVAD, ROBERT A. SAMSON, “*Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*”, *Fungal Biology*, Volume 115, Issue 11, 2011, Pages 1138-1150, ISSN 1878-6146, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.07.008>.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, ALEJANDRA & GRANILLO, ADRIÁN & MEDINA-CANALES, MA & RODRÍGUEZ-TOVAR, AÍDA & MARTÍNEZ-RIVERA, MARÍA. (2016). Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *BMC Microbiology*. 16. 10.1186/s12866-016-0859-4.

GUARRO J. Atlas of Soil Ascomycetes. Utrecht The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2012.

GUILGER-CASAGRANDE MARIANA , LIMA RENATA Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019 volume 7, ISSN 2296-4185 DOI 10.3389/fbioe.2019.00287 ISSN=2296-4185

HRUDAYANATH THATOIA, BIKASH C. BEHERAB & RASHMI R. MISHRA, 2013, Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review, *Mycology*, 4:1, 54-71, DOI: 10.1080/21501203.2013.785448.

ISMAIEL, A.; JAMBHULKAR, P.P.; SINHA, P.; LAKSHMAN, D.K. Trichoderma: Harzianum Clade in Soils from Central and South America. *J. Fungi* 2024, 10, 813. <https://doi.org/10.3390/jof10120813>

JINGJING WU, CONGHUA QIU, YAXIN REN, RENXIANG YAN, XIUYUN YE, AND GUOZENG WANG, 2018, Novel Salt-Tolerant Xylanase from a Mangrove-Isolated Fungus *Phoma* sp. MF13 and Its Application in Chinese Steamed Bread, *ACS Omega*, 3: 3708–3716 doi:10.1021/acsomega.8b00345

KATHIRESAN & KALAISELVAN, 2023 Mangrove Fungi for the Future, *KAVAKA* 59(1): 1-6 (2023) DOI: 10.36460/Kavaka/59/1/2023/1-6

KELLY JAQUELINE ALVES & MYLENNE CALCIOLARI PINHEIRO DA SILVA & SIMONE RAPOSO COTTA & JÚLIA RONZELLA OTTONI & JAN DIRK VAN ELSAS & VALERIA MAIA DE OLIVEIRA & FERNANDO DINI ANDREOTE, 2019 Mangrove soil as a source for novel xylanase and amylase as determined by cultivation-dependent and cultivation-independent methods, *Brazilian Journal of Microbiology*, 51:217–228. DOI:10.1007/s42770-019-00162-7

LI, QI-ZHANG et al. “Fungal immunomodulatory proteins: characteristic, potential antitumor activities and their molecular mechanisms.” *Drug discovery today* vol. 24,1 (2019): 307-314. doi:10.1016/j.drudis.2018.09.014

LYBBERT, TRAVIS & BARRETT, CHRISTOPHER. (2000). Is bioprospecting a viable strategy for conserving tropical ecosystems?. *Ecological Economics*. 34. 293-300. 10.1016/S0921-8009(00)00188-9.

MANGAL, M., BANSAL, S., & SHARMA, M. (2014). Macro and micromorphological characterization of different *Aspergillus* isolates. *Legume Research - An International Journal*, 37(4), 372. doi:10.5958/0976-0571.2014.00646.8

MARTINS, J. E. C., MELO, N. T. E HEINS-VACCARI, E. M. (2005). *Atlas de Microbiologia Média*, Copyright, Editora Manole Ltda, pp. 39-45.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Manguezal). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ed.). *ATLAS DOS MANGUEZAIS DO BRASIL*. [S. l.: s. n.], 2018. 1 atlas. Disponível em: https://ava.icmbio.gov.br/pluginfile.php/4592/mod_data/content/14085/atlas%20dos_manguezaais_do_brasil.pdf. Acesso em: 13 dez. 2023.

M, SEJAS & SILBERT, SUZANE & O, REIS & SADER, HELIO. (2003). Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39. 10.1590/S1676-24442003000100006

NG TB, CHEUNG RCF, WONG JH, CHAN YS, DAN X, PAN W, WANG H, GUAN S, CHAN K, YE X, LIU F, XIA L, CHAN WY. Fungal proteinaceous compounds with multiple biological activities. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Aug;100(15):6601-6617. doi: 10.1007/s00253-016-7671-9. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27338574.

NIGELLA MENDES DE PAULA, KRISLE DA SILVA, TATIANE BRUGNARI, CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK, GISELLE MARIA MACIEL, 2022, Biotechnological potential of fungi from a mangrove ecosystem: Enzymes, salt tolerance and decolorization of a real textile effluent, *Microbiological Research*, 254: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126899>

REYGAERT WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 2018 Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229; PMCID: PMC6604941.

SEVERN MM, HORSWILL AR. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Feb;21(2):97-111. doi: 10.1038/s41579-022-00780-3. Epub 2022 Aug 30. PMID: 36042296; PMCID: PMC9903335.

SILVA, D. M. et al. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 42, n. 2, p. 761–773, 2011.

SUNIL K. DESHMUKH, MANISH K. GUPTA, VED PRAKASH & M. SUDHAKARA REDDY, 2018, Mangrove-Associated Fungi: A Novel Source of Potential Anticancer Compounds, *Journal of Fungi*, 4:101; doi:10.3390/jof4030101

T.B NG, Peptides and proteins from fungi, *Peptides*, Volume 25, Issue 6, 2004, Pages 1055-1073, ISSN 0196-9781, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.013>.

TURAGA, RAMACHANDER. (2020). Peptaibols: Antimicrobial Peptides from Fungi. 10.1007/978-981-15-1394-7_26.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, v. 69, n. 1, p. 1, 6 jun. 2011.

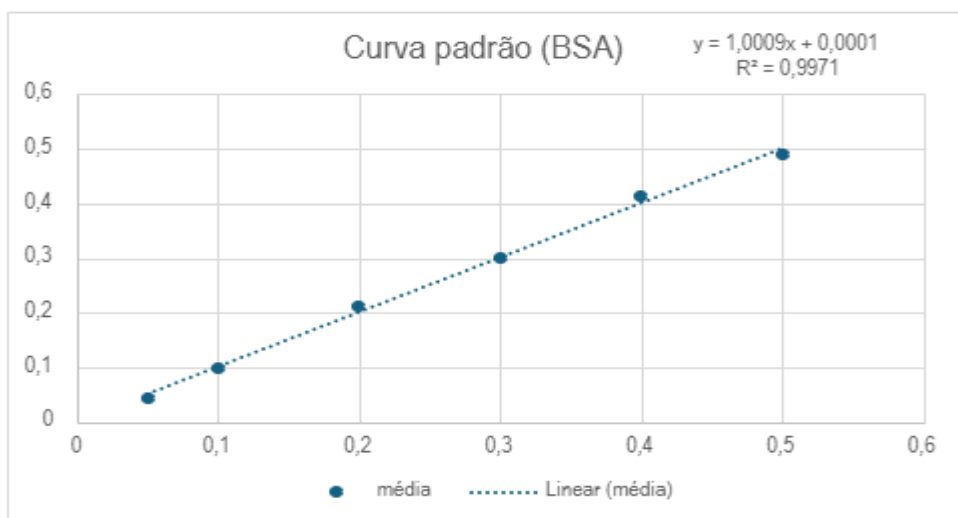
VILLAO-UZHO, Liliana et al . Biotechnological tools for genetic improvement of *Trichoderma*. *Scientia Agropecuaria*, Trujillo , v. 15, n. 2, p. 213-223, abr. 2024 . Disponible en <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172024000200213&lng=es&nrm=iso>.Epub27-Mar-2024.
<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2024.016>.

W. GAMS & W. MEYER (1998) What exactly is *Trichoderma harzianum*?, *Mycologia*, 90:5, 904-915, DOI: 10.1080/00275514.1998.12026984 To link to this article:
<https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026984>

WINN Jr, W.; KONEMAM, E.K.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KOMENAN, E.; SCRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Koneman's Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6 ed. Filadélfia (EUA): Lippincott Williams and Wilkins, 2005. 1535 p. ISBN 0781730147.

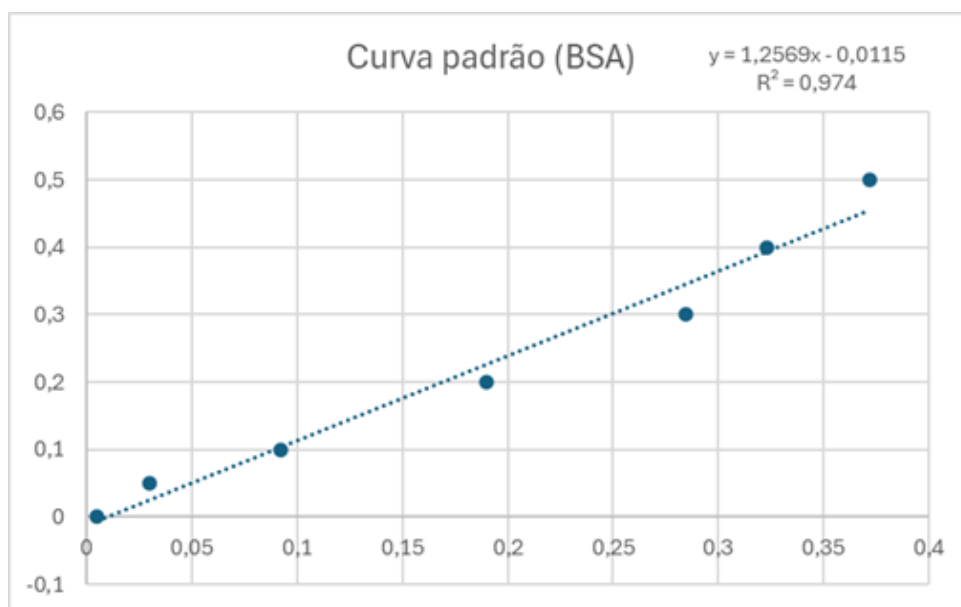
YADAV, AJAR NATH. (2021). Biodiversity and bioprospecting of extremophilic microbiomes for agro-environmental sustainability. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 9. 1-6. 10.7324/JABB.2021.9301.

MATERIAL SUPLEMENTAR



FiguraS1- Cuva padrão de albumina bovina (BSA) para quantificação de proteínas com Bradford

para as amostras do MQ2A. $R^2 = 0,997$ (Correspondente aos resultados da tabela 6)



FiguraS2: Curva padrão da albumina bovina (BSA) para determinação de proteínas dos isolados: AQ2A, AQ3A, MQ2A e MQ1C.

>10kDa $R^2 = 0.974$ (Correspondente a tabela 4)

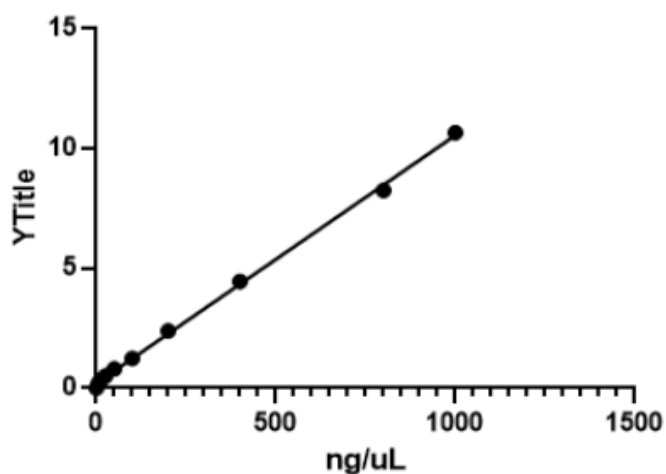


Figura S3: Regressão linear para estimar concentrações de peptídeos dos isolados AQ2A, AQ3A, MQ1C, MQ2A utilizando curva padrão e espectrofotômetro UV/VIS Thermo fisher. $R^2 = 0.9989$ (correspondente a tabela 5)

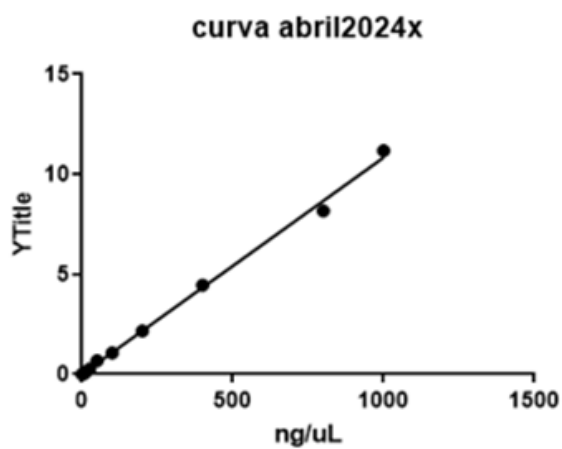


Figura S4: Regressão linear para estimar concentrações dos peptídeos do isolado MQ2A em meio aquoso ou MGLP tanto intra quanto extracelular. Utilizando curva padrão e espectrofotômetro UV/VIS Thermo fisher. $R^2 = 0.9989$

Resultado do sequenciamento de DNA:

MQ2A

ITS1
TGTTTTGGCTCGRTGAGGCTCTGGGTACCTCCACCCGTGTTTATT
TTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCSCCTTAACCTGGCCGCGGGGGG
CTTACGCCCGCGGGCCCGCGCCGGAAGACACCCCTCGAACTCT
GTCTGAAGATTGAGTCTGAGTGAATAATAAATTATTTAAACTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGAGCGAAAT
GCGATCGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAG
CGTCAATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGCTOCT
CCGATCCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCG
TCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCTGTAGGCC
GGCCCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCATAGCGGAG
GAAACGAGTGAGGGCTCTGGGTCACTCMCSYKTTATTTTWCCTGT
TGCTTCGCGGGCCCKYAMTGGTSCGGGGGGGCTKAGCGCGGGCGC
SAASAACYCAMWYGTYYGARGAATGTGAGTCKRRKGAMAATATAA
AATAWTTTTAWAACTTTWCMGGAATCTYTTGGCTTSKSGTCATCA
AGGAGMACAAAGKCACTACKATATGGTGAAGKCAAKCAGAATACAT
GCTYGAWCGYGAWGATSTMGYGATCKGAYRKMGGWSGTYRGTCGA
CWCCTKCTATRCGTGCGTGTGCAAKCGATTGMGTSATGWTCTCGA
TGC

MQ1C

ITS1
GSSMMKKKGGGGAAGCTGSKYGGGTTTCGTAGGTGACCTGCGGAG
GATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTG
TCTATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCG
CCGGGGAGGCCCTTGCGCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACC
CCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGT
AATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATG
AAGAACGCGAGGAAATCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGG
GGGCATGCCGTGTCOGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTT
GTGTGTTGGGCCCGCTCCCGCTCTCCCGGGGACGGGCCCGAA
AGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTT
GTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGCCAGCCGACACCCAACT
TTATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAAA

AQ2A

ITS1F
TAGGCTTCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGCGGGTC
CTTTGGGCCCAACCTCCCATCGGTGTCTATTATACCTGTTGCTTCG
GCGGGCCCGCGCTTGTGCGCCGCGGGGGGGCGCCTTTGCCCC
CCGGGCCCGTGCCCGCCGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGA
AAGCGTGCACTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAAC
AATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGC
GATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGCCGAG
CGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGTTGGTCCGCCGTCC
CCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGC
GTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATT
GGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCAACCATTTTTCCAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAARGCGSG
RRRRAA

ITS4
AGGACTACTGATCGAGGTACCTGGATAAAATTTGGGTTGATCGGCAAG
CGCCGGCCGGCCCTACAGAGCGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGA
GGACCGGACGCGGTGCGCCGCTGCTTTTCGGGGCCGTCGCCCGGG
ATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAAT
GACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGT
GCGTTCAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATC
GCATTTGCTGCTGCTTCTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGA
GTTGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGTAAGCCCC
CCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTAAATAA
ACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATC
CTTCGCGAGTACCYYMWSRRAGAGCGARTGRRGGCTCTGGGTCAC
TCMCSYGTATWTTACTTGTGCTTCGCGGGGCKYAACKGGSCGGG
GGGTTAKCGGGCGSCSMRAMCWTSAMTYGTTYKARAAGWTWRTYG
TRTKAAAAATAAAATTTTAAACTTYAACAAGGACYTGTGTTGCGGT
CAGTCAATAGMCCAAATSAMKMATATGTMATGCAAGTMTGATGTMGAYT
CGAACGYGTGGAGTCGCGYRGATCAKCTRGSTCYGCGMYGCATKCGTC
RACGGGWTMGRCTTMAYGA

ITS4
TAGGTCAACCTTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCG
GGCCTACAGAGCAGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACG
CGGTGCGCGCGCTGCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGGAGAGGGGGAC
GGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCG
GACAGGCATTGCCCGCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAA
GACTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTC
CTGCGTTCCTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT
TAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTAGAACAGCGTTC
ATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGCAAGGCCTCC
CCGGCGGCCGTGAAACGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTACGA
TAGACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATG
ATCCTTCGCGAGGTTCACTACGGAACCTGTTACGACTTTTACTTCT
CTAATKKGACCAAGA

ITS4
TAGGTCAACCTTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCG
GGCCTACAGAGCAGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGAC
GCGGTGCGCGCGCTGCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGGAGAGGGGGA
CGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTC
GGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAA
AGACTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTC
GCTGCGTTCCTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTAGAACAGCGTT
CATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGCAAGGCCTC
CCGGCGGCCGTGAAACGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTACG
ATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAAT
GATCCTTCGCGAGGTTCACTACGGAACCTGTTACGACTTTTACTTCT
CTCTAATKKGACCAAGA

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: FELIPE RICARDO DE MELLO

Título: "Isolamento e caracterização de fungos de manguezal e prospecção de polipeptídeos bioativos"

Orientador: Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro	A
Profa. Dra. Ana Julia Fernandes	A

PARECER:

O aluno durante a sua apresentação demonstrou conhecimento sobre o seu trabalho, respondendo aos questionamentos da banca. A pesquisa desenvolvida apresenta resultados para um potencial biotecnológico.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que o discente **Felipe Ricardo de Mello** obteve o seguinte conceito:



APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 01 de julho de 2025.

Leandro Mantovani de Castro.

Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro



Profa. Dra. Ana Julia Fernandes