

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

KAREN KELLY CARVALHO DE OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE RECURSOS NATURAIS CONTRA
Staphylococcus aureus

MANAUS
2019

KAREN KELLY CARVALHO DE OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE RECURSOS NATURAIS CONTRA
Staphylococcus aureus

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Saúde.

Orientador: Dr. Luiz Antonio de Oliveira

Coorientadora: Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

MANAUS
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Karen Kelly Carvalho de

O48a Atividade antibacteriana de recursos naturais contra
Staphylococcus aureus / Karen Kelly Carvalho de
Oliveira. 2019

113 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luiz Antonio de Oliveira

Coorientadora: Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Resistência bacteriana. 2. Trichoderma spp.. 3. Banana.
4. Compostos bioativos. 5. Screening. I. Oliveira, Luiz

KAREN KELLY CARVALHO DE OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE RECURSOS NATURAIS CONTRA
Staphylococcus aureus

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Saúde.

Aprovada em 28 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Raimundo Felipe da Cruz Filho, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Teresa Alarcon Castillo, Membro
Universidade Intercultural da Amazônia

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Larissa de Souza Kirsch, Membro
Universidade do Estado do Amazonas

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ajudar-me a superar os obstáculos durante os anos de curso.

Ao meu marido Lucas de Souza, pela valiosa ajuda, a qual foi fundamental para que eu concluísse este curso.

Ao meu filho Guilherme, por inspirar-me todos os dias.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo e licença maternidade.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, por ceder a estrutura necessária para realização das atividades.

À Fiocruz por ceder as culturas de *Trichoderma*, os patógenos e alguns materiais necessários a esta pesquisa.

Ao meu orientador Dr. Luiz Antonio de Oliveira, pela orientação durante o curso de mestrado e doutorado.

À Dra. Ormezinda Fernandes, pela valiosa colaboração desde a elaboração do projeto até o resultado final do mesmo.

Ao estatístico Antônio Balieiro, da Fiocruz, pela análise dos dados do bloco de gelose e ao Raimundo Felipe da Cruz Filho, da Universidade Federal do Amazonas, por auxiliar-me na análise dos dados do teste antibacteriano.

Ao Weison Lima, pela ajuda na realização da cromatografia em camada delgada.

À Josy Caldas, por sempre atender meus pedidos e ser tão prestativa mesmo tendo seus próprios experimentos para desenvolver.

À Thaissa Oliveira, pela fundamental ajuda nos experimentos e por sua energia sempre positiva.

À Mirna Miyamoto, pelo apoio e por tentar solucionar todo tipo de problema que aparecesse.

Ao Francisco Wesen, pelo suporte fornecido durante os trabalhos desenvolvidos no laboratório.

À toda equipe do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia.

Muito obrigada!

RESUMO

A bactéria resistente mais familiar na área clínica é *Staphylococcus aureus*, que apesar de estar presente naturalmente na população, tem se tornado resistente a múltiplos fármacos. A busca por moléculas antibacterianas a partir de produtos naturais é de fundamental importância econômica e social, pois tem grande potencial para a obtenção de novos antibióticos. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de *Trichoderma* spp. contra *S. aureus*. Inicialmente os fungos foram avaliados pelo método do bloco de gelose, agrupando-se os fungos produtores de antibacterianos de acordo com a similaridade de seus resultados. Deste modo, foi selecionado um fungo de cada grupo, os quais foram cultivados em diferentes condições de meio de cultivo, pH e luminosidade. Após o cultivo e a obtenção dos filtrados, estes tiveram sua atividade antibacteriana avaliada e os seis filtrados mais promissores foram selecionados para a determinação de suas concentrações inibitórias (CIM) e bactericidas mínimas (CBM). A seguir realizou-se cromatografia em camada delgada, bioautografia e teste de citotoxicidade. Para a etapa do cultivo em meio líquido de *Trichoderma* spp., inicialmente optou-se por elaborar um meio de cultivo utilizando resíduos alimentícios, entre eles a casca de banana. Porém, durante os testes constatou-se que a infusão destas cascas possui atividade anti-*Staphylococcus*; por isso o segundo capítulo deste trabalho visou avaliar a atividade antibacteriana de cascas e de polpas de três variedades de banana, verdes e maduras, contra cepas de *S. aureus*, selecionar a variedade mais promissora e testar diferentes formas de extração para definir o método mais eficaz. As três melhores amostras de infusão de banana foram selecionadas para determinação da CIM e CBM. Dos 98 fungos testados pelo método do bloco de gelose, 58 inibiram uma ou mais cepas de *S. aureus*. A partir de então, quatro culturas de *Trichoderma* spp. foram cultivadas sob diferentes condições. Observou-se que as condições de cultivo influenciaram na síntese dos compostos antibacterianos das quatro linhagens. Além disso, não houve uma única condição que pudesse ser considerada a ideal para todos os fungos. A CIM dos filtrados variou de 0,16 a >7,5 mg/mL e a CBM variou de 0,31 a >7,5 mg/mL. Quando submetidos à cromatografia em camada delgada, os filtrados obtidos do mesmo fungo apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, porém não foi possível comparar os resultados obtidos na bioautografia. No teste de citotoxicidade, não foi observada toxicidade para células VERO nas concentrações testadas. Em relação à banana, as três variedades inibiram o crescimento dos patógenos, sendo que a casca da banana prata inibiu maior número de *S. aureus*, por isso ela foi submetida a diferentes formas de extração. As amostras de infusão mais eficientes foram submetidas ao teste de CIM, obtendo valor mínimo de 0,62 mg/mL e máximo de 5,0 mg/mL. A CBM variou de 0,62 a >5,0 mg/mL. Diante dos resultados apresentados, evidenciou-se que filtrados de *Trichoderma* spp. e infusões de banana são eficientes na inibição de crescimento de *S. aureus*, sendo a casca de banana Prata mais indicada para a extração desses compostos em comparação aos fungos.

Palavras-chave: Resistência bacteriana. *Trichoderma* spp. Banana. Compostos bioativos. *Screening*.

ABSTRACT

The most common resistant bacterium in the clinical area is *Staphylococcus aureus*, which although present naturally in the population, has become resistant to multiple drugs. The search for antibacterial molecules from natural products is fundamental economic and social importance, as it has great potential to obtain new antibiotics. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antibacterial activity of *Trichoderma* spp. against *S. aureus*. Initially the fungi were evaluated by the gelose block method, combining the antibacterial-producing fungi according to the similarity of their results. In this way, a fungus of each group was selected, which were cultivated in different conditions of culture medium, pH and luminosity. After cultivation and filtration, these had their antibacterial activity evaluated and the six most promising filtrates were selected for the determination of their minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations. Thin layer chromatography, bioautography and cytotoxicity testing were then performed. For the stage of liquid culture of *Trichoderma* spp., It was initially chosen to elaborate a culture medium using food residues, among them the banana peel. However, during the tests, it was found that the infusion of these peels had anti-*Staphylococcus* activity, so the second chapter of this work aimed to evaluate the antibacterial activity of peels and pulps of three banana varieties, ripe and unripe, against strains of *S. aureus*, select the most promising variety and test different forms of extraction to define the most effective method. The three best banana infusion samples were selected for MIC and MBC determination. Of the 98 fungi tested by the gelose block method, 58 inhibited one or more *S. aureus* strains. Thereafter, four cultures of *Trichoderma* spp. were grown under different conditions. It was observed that the culture conditions influenced the synthesis of the antibacterial compounds of the four lines. In addition there was not a single condition that could be considered the ideal for all the fungi. The MIC of the filtrates ranged from 0.16 to 7.5 mg/mL and MBC ranged from 0.31 to 7.5 mg/mL. When subjected to thin layer chromatography, the filtrates obtained from the same fungus presented similar chromatographic profiles, but it was not possible to compare the results obtained in the bioautography. In the cytotoxicity test, no toxicity was observed for VERO cells at the concentrations tested. In relation to banana, the three varieties inhibited the growth of the pathogens, and the bark of the silver banana inhibited a greater number of *S. aureus*, so it was submitted to different forms of extraction. The most efficient infusion samples were submitted to the MIC test, obtaining a minimum value of 0.62 mg/mL and a maximum of 5.0 mg/mL. CBM ranged from 0.62 to >5.0 mg/mL. In view of the presented results, it was evidenced that filtered of *Trichoderma* spp. and banana infusions are efficient in the inhibition of growth of *S. aureus*, being the banana peel Silver most suitable for the extraction of these compounds in comparison to fungi.

Key words: Bacterial resistance. *Trichoderma* spp. Banana. Bioactive compounds. Screening.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Resistência antimicrobiana a nível de comunidade (a) e a nível celular (b).....	18
Figura 2 - Colônias de <i>Trichoderma</i> cultivadas em meio Batata-Dextrose-Ágar. A: <i>Trichoderma</i> sp.; B: <i>T. virens</i>	23

CAPÍTULO I

Figura 1 - Método de inoculação em microplacas de 96 poços para determinação da atividade antibacteriana dos filtrados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos de diferentes condições de cultivo.....	38
Figura 2 - Método de inoculação em microplacas para determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	40
Figura 3 – Diferentes tamanhos de halos de inibição de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Staphylococcus aureus</i> . A: <i>T. harzianum</i> CFAM 1218 contra CBAM 0323; B: <i>T. virens</i> CFAM 0255 contra CBAM 0318; C: <i>T. virens</i> CFAM 0255 contra CBAM 0319. No centro da placa disco controle contendo antibiótico cloranfenicol.....	46
Figura 4 - Resultado da análise de <i>cluster</i> dos halos obtidos nos testes de bloco de gelose....	48
Figura 5 - Perfis cromatográficos de filtrados obtidos de <i>Trichoderma</i> spp., onde: 1: <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0, 2: <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0, 3: <i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0, 4: <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0, 5: <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0, 6: <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0. Reveladores: A: UV 365 nm, B: UV 254 nm, C: anisaldeído, D: cloreto férrico, E: Dragendorff, F: iodo.....	62
Figura 6 - Curvas de viabilidade celular dos filtrados obtidos de <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 no ensaio de citotoxicidade contra células VERO.....	64
Figura 7 - Curvas de viabilidade celular do filtrado obtido de <i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1155 no ensaio de citotoxicidade contra células VERO.....	65

CAPÍTULO II

Figura 1 - Variáveis trabalhadas na extração de compostos antibacterianos da casca da banana Prata.....	71
Figura 2 - Método de inoculação em microplacas de 96 poços para determinação da atividade antibacteriana dos extratos de casca de banana Prata contra <i>Staphylococcus aureus</i>	72
Figura 3 - Atividade antibacteriana de infusões de banana contra <i>Staphylococcus aureus</i> . A: casca de banana Pacovan madura x CBAM 0319; B: casca de banana Maçã madura x CBAM 0318; C: casca de banana Prata madura x CBAM 0318.....	76

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Manifestações clínicas ocasionadas por infecções de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Culturas de <i>Trichoderma</i> selecionadas para a avaliação da atividade antibacteriana.....	32
Tabela 2 - Culturas clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas para realização dos testes antibacterianos.....	34
Tabela 3 - Condições de cultivo utilizadas no cultivo submerso de <i>Trichoderma</i> spp. selecionados.....	36
Tabela 4 - Esquema de preenchimento dos poços das microplacas.....	38
Tabela 5 - Concentrações dos filtrados utilizados no teste de citotoxicidade contra células VERO.....	42
Tabela 6 - Resultados do teste do bloco de gelose de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Tabela 7 - Crescimento bacteriano das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0194 expresso em valores de absorbância (595 nm).....	50
Tabela 8 - Crescimento bacteriano das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235 expresso em valores de absorbância (595 nm).....	52
Tabela 9 - Crescimento bacteriano das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 expresso em valores de absorbância (595 nm).....	54
Tabela 10 - Crescimento bacteriano das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1155 expresso em valores de absorbância (595 nm).....	56
Tabela 11 - Resultado do teste de microdiluição para identificação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos filtrados de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Staphylococcus aureus</i>	61

Tabela 12 - Valores dos Fatores de retenção (R_f 's) presentes nas amostras eluídas nas cromatoplacas e determinação de sua ação antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 80958 através de bioautografia.....	63
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Culturas clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas para realização dos testes antibacterianos.....	70
Tabela 2 - Atividade antibacteriana de infusões de cascas e polpas de banana Pacovan, Maçã e Prata contra <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Tabela 3 - Valores de absorbância obtidos após leitura de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em leitor de microplacas (595) após ensaio de atividade antibacteriana de infusões obtidas da casca da banana Prata madura.....	79
Tabela 4 - Concentração Inibitória e Bactericida Mínima de infusões obtidas a partir da casca da banana Prata (<i>Musa</i> spp.) contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BD	Batata dextrose
BDA	Batata dextrose ágar
CBAM	Coleção de bactérias da Amazônia
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFAM	Coleção de fungos da Amazônia
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Mueller-Hinton
IPCLS	Infecção primária de corrente sanguínea com confirmação laboratorial
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
OMS	Organização Mundial de Saúde
R_f	<i>Retention factor</i>
SCoN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase negativo
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina
YES	Extrato de levedura e sacarose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Antibióticos	16
3.2 Resistência antimicrobiana e obtenção de novos compostos	16
3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.4 Características do gênero <i>Trichoderma</i>	22
3.4.1 Compostos bioativos	23
3.5 Propriedades da bananeira (<i>Musa spp.</i>)	25
3.5.1 Casca de banana	27
CAPÍTULO I	29
CAPÍTULO II	67
4 CONCLUSÃO GERAL	83
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS NA LEITURA DE CRESCIMENTO MICROBIANO EM LEITOR DE MICROPLACA (595 NM) PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FILTRADOS DE <i>Trichoderma spp.</i>	93
APÊNDICE B – RESULTADOS OBTIDOS NA LEITURA DE CRESCIMENTO MICROBIANO EM LEITOR DE MICROPLACA (595 NM) PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE EXTRATOS AQUOSOS DE BANANA (<i>Musa spp.</i>)	104

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dos antibióticos reduziu significativamente o número de morbidade e mortalidade associadas a infecções. Entretanto, o sucesso na terapia antimicrobiana foi acompanhado pelo surgimento de microrganismos resistentes a todos os antimicrobianos existentes (RANG *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, poucos agentes antimicrobianos de novas classes tornaram-se disponíveis. Em contrapartida, doenças infecciosas emergentes e re-emergentes, doenças infecciosas oportunistas e infecções por microrganismos resistentes a fármacos continuam a acometer seres humanos (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são usualmente encontradas no ambiente hospitalar, sendo que a espécie mais comum e uma das mais virulentas deste gênero é *Staphylococcus aureus* (LIMA, 2015). Esta espécie é responsável por causar várias doenças, desde infecções cutâneas até bacteremia, estando associada a altas taxas de morbidade e mortalidade. Uma característica importante é a sua capacidade de aderir a materiais protéticos e à formação de biofilmes em várias superfícies, que inclui implantes e cateteres. Além disso, assim como outras bactérias patogênicas, a *Staphylococcus* sp. possui capacidade de desenvolver resistência a agentes antimicrobianos (SANTOS *et al.*, 2018).

Historicamente, os produtos naturais fizeram e continuam a fazer uma contribuição indispensável para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de muitas das doenças que afligem a humanidade (CRAGG; KATZ; NEWMAN, 2012). Isso se deve à diversidade de espécies de plantas, animais e microrganismos, que resulta em grande quantidade e variedade de metabólitos secundários, os quais desempenharam e podem desempenhar um papel vital nesse processo de descoberta de novos medicamentos (GUO, 2017).

As vantagens atribuídas à descoberta de fármacos baseados em produtos naturais em relação à produção por síntese química são várias: produtos naturais oferecem diversidade química com complexidade estrutural; muitos antibióticos naturais possuem mecanismos complexos de ação que não podem ser concebidos por síntese química; além disso, milhões de anos de evolução aperfeiçoaram os antibióticos com relação à afinidade e especificidade para os seus alvos (RADIC; BRATKOVIC, 2012; KRAUSE; TOBIN, 2013).

As plantas sempre foram uma fonte para a descoberta de novos biocompostos, porém, calcula-se que apenas 5 a 15% delas tenham sido investigadas quimicamente e

farmacologicamente de forma sistêmica. Dessa forma, é possível que muitos vegetais ainda contenham substâncias de valor medicinal e farmacêutico que ainda não foram pesquisadas. No início dos anos 1900, 80% de todos os medicamentos foram obtidos a partir de raízes, cascas e folhas. Em 2013, aproximadamente 25% de todas as drogas prescritas eram originárias de plantas (KRAUSE; TOBIN, 2013). Uma vez que estas podem produzir várias substâncias com propriedades medicinais, programas de *screening* precisam ser desenvolvidos para a busca de possíveis novos compostos bioativos, incluindo os antibióticos.

Outra fonte conhecida de produtos naturais são os microrganismos, principalmente os fungos, que têm fornecido um grande número de moléculas bioativas, levando ao desenvolvimento de importantes produtos farmacêuticos, dentre os quais: agentes antibacterianos, agentes imunossupressores, agentes redutores de colesterol, entre outros compostos (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2012).

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam propriedades antimicrobianas e versatilidade metabólica que os tornam bons candidatos para a descoberta de drogas contra infecções causadas por patógenos fúngicos, virais e bacterianos, que causam doenças em plantas e animais, incluindo humanos (SANTOS *et al.*, 2018). Em relação à produção de antibacterianos, esta tem sido relatada por diversos autores, porém tem sido pouco explorada em comparação à sua utilização no controle biológico de fitopatógenos (PIRES *et al.*, 2015; NARENDHAN; KATHIRESAN, 2016; SANTOS *et al.*, 2018).

Desta forma, esta pesquisa visou explorar esta potencialidade dos produtos naturais, buscando compostos antibacterianos a partir de três variedades de bananeira (*Musa* spp.) e de fungos do gênero *Trichoderma*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana de *Trichoderma* spp. e variedades de bananeira (*Musa* spp.) contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

2.2 Específicos

Avaliar a atividade antibacteriana de isolados de *Trichoderma* spp. e infusões de banana (*Musa* spp.) das variedades Pacovan, Prata e Maçã contra cepas de *S. aureus*;

Avaliar o efeito do meio de cultivo, luminosidade e pH na produção de antibacterianos pelos *Trichoderma* spp.;

Testar diferentes formas de extração dos compostos antibacterianos da variedade de bananeira mais promissora;

Identificar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos filtrados fúngicos e das infusões de banana mais promissores;

Separar os filtrados mais promissores em frações e determinar qual delas inibe o patógeno;

Realizar teste de citotoxicidade e identificar a IC₅₀ dos filtrados mais promissores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Antibióticos

A definição de antibiótico foi proposta pela primeira vez por Selman Waksman, o descobridor da estreptomicina e pioneiro na utilização de solos para a busca de produtos biológicos. Porém, este conceito não definia a classe do composto ou sua função, apenas sua aplicação. O termo antibiótico passou então a ser utilizado para denotar qualquer classe de molécula orgânica capaz de inibir ou matar micróbios por interações específicas com seus alvos, sem levar em consideração a fonte do composto ou a sua classe (DAVIES; DAVIES, 2010).

A descoberta dos antibióticos é considerada uma das mais importantes de todos os tempos em relação à saúde humana, que salvou inúmeras vidas, tornando-se uma ponte de virada na história de vida humana (DAVIES; DAVIES, 2010). Sua história inicia com a descoberta da penicilina em 1928, por Alexandre Fleming. No entanto, este antimicrobiano só foi introduzido na clínica em 1940. A penicilina, que é excelente agente em termos de segurança e eficácia, liderou a era da quimioterapia antimicrobiana, salvando a vida de muitos soldados feridos durante a Segunda Guerra Mundial (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

Contudo, apesar do aparente fim das doenças infecciosas, no final da década de 1940 surgiram as primeiras cepas resistentes à penicilina. Como solução a esse problema, foi desenvolvida a meticilina, cuja finalidade era tratar infecções causadas por *S. aureus* resistentes à penicilina. Visando aumentar o espectro de ação dos antimicrobianos, foi criada a ampicilina, que além de ser eficaz contra bactérias Gram-positivas também o é contra bactérias da família Enterobacteriaceae (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

3.2 Resistência antimicrobiana e obtenção de novos compostos

A resistência bacteriana aos antibióticos é conhecida praticamente desde o início da era dos antibióticos, mas apenas recentemente o surgimento de cepas resistentes ocorreu com regularidade alarmante. Esse fato, associado à diminuição do fluxo de antibióticos, levou alguns a afirmarem que uma era pós-antibiótica é eminente (FAIR; TOR, 2014).

Essa diminuição na produção de antibióticos tem várias causas: esse tipo de medicamento é utilizado por períodos limitados, tornando-o menos lucrativos que os utilizados no tratamento de doenças crônicas; eles não são imediatamente utilizados após a

sua aprovação e são prescritos apenas para infecções que os antibióticos mais estabelecidos não podem tratar, o que limita o retorno do investimento inicial; diminuição da tolerância para os efeitos colaterais dos antibióticos e aumento dos requisitos de aprovação durante os ensaios clínicos, entre outros (FAIR; TOR, 2014).

Por algum tempo, acreditou-se que a resistência bacteriana ocorria somente no ambiente hospitalar, no entanto, hoje se sabe que ela ocorre por diversos fatores, dentre eles o uso excessivo e inapropriado de antimicrobianos pela população (responsável por exercer pressão seletiva sobre os microrganismos); práticas terapêuticas inadequadas; uso indiscriminado de antimicrobianos na agricultura e na pecuária e o aumento da mobilidade de pessoas em todo o mundo, que pode favorecer a evolução, disseminação de patógenos resistentes a múltiplas drogas, além das práticas ineficazes de controle de infecção que aceleram a sua propagação (PAPHITOU, 2013).

Outros prováveis motivos para o surgimento da resistência microbiana são a falta de compreensão para os possíveis perigos do uso inadequado e não regulamentado de antibióticos em áreas não médicas, que também acabam criando ambiente favorável ao surgimento de patógenos resistentes a uma ou mais drogas (THEURETZBACHER, 2012; HWANG; GUMS, 2016).

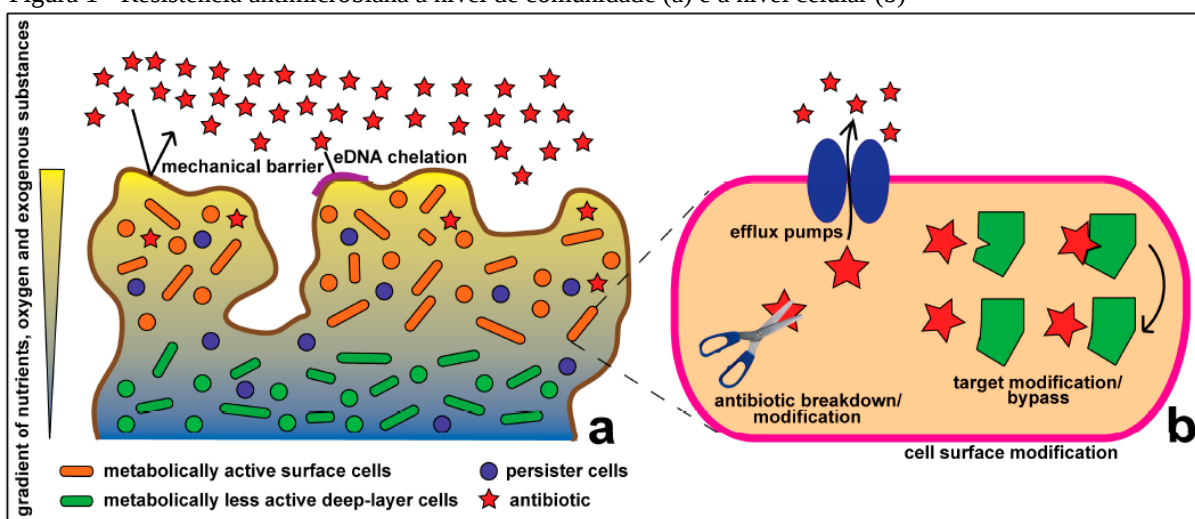
O uso de antibióticos fora do nicho humano é uma das importantes razões para a disseminação de bactérias resistentes (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011). Eles têm várias aplicações na agricultura e, de forma semelhante ao uso de todos os antibióticos, são capazes de promover a seleção de bactérias resistentes. Os animais podem servir como reservatórios e disseminadores de cepas resistentes através dos alimentos, bem como contato direto ou indireto (PAPHITOU, 2013).

O uso de antibióticos na agricultura pode promover a transferência genética horizontal entre diferentes espécies bacterianas no intestino dos animais e dos seres humanos da seguinte forma: *Salmonella* e *Campylobacter* tornam-se resistentes e transferem genes de resistência antibiótica para a flora humana natural, como a bactéria *Enterococcus*, por exemplo. Além disso, sabe-se que a alta resistência da *Escherichia coli* à ciprofloxacina está associada ao uso de fluoroquinolonas na avicultura (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011).

Embora não haja dúvidas da contribuição humana para a evolução da resistência bacteriana, há também a resistência ocorrente de forma natural. A resistência aos primeiros antibióticos da classe, como a penicilina G e a estreptomicina, foi observada logo após o isolamento inicial destes compostos. Embora não seja a regra, esse tipo de fenômeno é típico quando se examina o arsenal antibiótico como um todo (FAIR; TOR, 2014).

A resistência microbiana pode ocorrer a nível celular e a nível de comunidade. No segundo caso, algumas bactérias são vistas como um organismo multicelular, cujas interações são mediadas por sinalização celular complexa. Estas interações podem levar à formação de matrizes espacialmente complexas de polissacarídeo e DNA extracelular, em que as células estão incorporadas para formar uma comunidade de biofilme. Nesse caso, um grupo de bactérias pode ser tolerante ao estresse ambiental enquanto as células individuais não podem, sendo resistentes, portanto, somente ao nível de comunidade (FIGURA 1) (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015; CHENG *et al.*, 2016).

Figura 1 - Resistência antimicrobiana a nível de comunidade (a) e a nível celular (b)



Fonte: Penesyan; Gillings; Paulsen (2015).

A resistência bacteriana passou a ser reconhecida como um dos principais desafios médicos na maioria dos sistemas de saúde (THEURETZBACHER, 2012). Isto acarreta em imenso impacto social e financeiro, pois as opções terapêuticas até mesmo para infecções comuns são limitadas ou indisponíveis quando estas são causadas por bactérias resistentes (PAPHITOU, 2013). E, apesar da grande variação regional e local na ocorrência de bactérias resistentes, a maioria dos médicos está ciente dos problemas causados por estes microrganismos (THEURETZBACHER, 2012).

Entre 1981 e 2010, cerca de 68% dos medicamentos aprovados para o tratamento de infecções causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas, foram originados, derivados ou inspirados em produtos naturais. Apesar de serem fonte de estruturas únicas e inovadoras no processo de descoberta de medicamentos, em muitos casos, o composto isolado da fonte natural não é adequado para o desenvolvimento de um medicamento eficaz; no entanto, este composto pode ser utilizado para formar a base de elaboração de outras substâncias químicas

ou também pode ser feita modificação bioquímica e otimização estrutural no processo (CRAGG; KATZ; NEWMAN, 2012).

No caso da síntese de biocompostos por microrganismos, a escolha dos parâmetros de cultivo é primordial para o número de metabólitos secundários produzidos. Até mesmo pequenas mudanças no meio de cultura podem afetar não só a quantidade de um determinado composto, mas também o perfil metabólico geral do microrganismo. Assim, a modificação de fatores nutricionais ou ambientais pode promover a biossíntese de metabólitos secundários e, dessa forma, facilitar a descoberta de novos produtos naturais (SCHERLACH; HERTWECK, 2009). Por isso, a variação dos fatores ambientais no cultivo dos microrganismos é uma das alternativas que podem ser adotadas na busca por novos compostos antibióticos.

3.3 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias resistentes mais conhecida na área clínica. Além de estar presente nas infecções hospitalares, ela é frequentemente encontrada em infecções da comunidade, sendo que aproximadamente 20% a 40% dos adultos saudáveis possuem este microrganismo em sua microbiota como um comensal nasal (RATTI; SOUSA, 2009). Nos últimos anos, este patógeno resistente a múltiplos fármacos emergiu como a principal causa de infecção hospitalar (DAVIES; DAVIES, 2010).

A palavra “*Staphylococcus*” tem origem em duas palavras gregas, “*staphyle*”, que significa “cachos de uva”, e “*coccus*”, que significa “bactérias esféricas”; “*aureus*” tem origem latina e significa “ouro”, e foi dado a essas bactérias devido à sua coloração característica (BITRUS *et al.*, 2018).

São classificadas como Gram-positivas, não móveis, não formadoras de esporos, possuem forma esférica e quando visualizadas em microscópio óptico após coloração de Gram aparecem como colônias azuladas em forma de cachos de uva, porque a divisão celular ocorre em diferentes planos. A *S. aureus* é um organismo anaeróbico facultativo, que forma colônias brancas ou amarelas em meios de ágar ricos em nutrientes (GNANAMANI; HARIHARAN; SATYASEELA, 2017; BITRUS *et al.*, 2018).

Ela é frequentemente hemolítica em ágar sangue devido à produção de quatro tipos de hemolisinas: alfa, beta, gama e delta. Quase todos os isolados de *S. aureus* produz a enzima coagulase, fator de virulência que é critério no seu processo de identificação. É um organismo tolerante ao sal, sendo capaz de crescer em meio ágar sal-manitol. Também é catalase positivo e oxidase negativo (GNANAMANI; HARIHARAN; SATYASEELA, 2017).

Os membros do gênero *Staphylococcus* são onipresentes e altamente versáteis. Podem ser encontrados na pele, membranas mucosas, glândulas da pele, solo, água e ar. A espécie *S. aureus* é muito resistente e pode sobreviver em superfícies secas durante um longo período (BITRUS *et al.*, 2018).

A penicilina foi o primeiro antibiótico beta-lactâmico descoberto em 1928 e considerado eficaz contra as infecções por *S. aureus*. Porém, na década de 40, pouco tempo depois da introdução deste antibiótico nas clínicas, foram detectadas cepas de *S. aureus* resistentes a ele. Estas cepas produziram uma enzima β -lactamase codificada por plasmídeos que hidrolizou a ligação β -lactama e inativou a atividade antibacteriana da penicilina. Na década de 1950, a resistência à penicilina foi restrita aos isolados hospitalares de *S. aureus*. No final dos anos 60, mais de 80% de *S. aureus* isolados, independentemente de origem comunitária e hospitalar, foram resistentes à penicilina graças à transferência plasmidial do gene da penicilinase (*blaZ*) e à disseminação clonal de cepas resistentes (GNANAMANI; HARIHARAN; SATYASEELA, 2017). Atualmente, mais de 90% dos isolados estafilocócicos produzem penicilinase e são resistentes à penicilina (CRAFT *et al.*, 2019).

Assim, foram realizadas substituições da cadeia natural da penicilina, criando variantes semissintéticas que não eram substratos para a β -lactamase, surgindo assim em 1960 a meticilina. Ela foi introduzida nas clínicas em 1961, no entanto, em menos de um ano, isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram reportados. Estas cepas resistentes se espalharam rapidamente pelo mundo, o que resultou em alta morbidade e mortalidade e aumento no custo dos cuidados de saúde (FOSTER, 2017; GNANAMANI; HARIHARAN; SATYASEELA, 2017; BITRUS *et al.*, 2018).

Essas bactérias são responsáveis por muitas infecções hospitalares, comunitárias e intoxicações. Dão origem a uma grande variedade de infecções clínicas, podendo atingir diferentes órgãos e tecidos. Essas infecções ocorrem em consequência da liberação de diversas toxinas, em nível local ou sistêmico, envolvendo várias doenças, dependendo da localização da infecção (ZURITA *et al.*, 2010) (Tabela 1).

As infecções por *Staphylococcus* ocorrem quando a imunidade do hospedeiro está baixa como resultado de doenças, feridas abertas, ou tratamento com esteróides ou outras drogas que comprometem a imunidade. Esta característica é devido ao fato de que estes patógenos possuem extenso arsenal de fatores de virulência que o permitem se aproveitar de uma falha no sistema imune do hospedeiro (CRAFT *et al.*, 2019).

Além disso, *S. aureus* pode viver em estado de biofilme, que são populações organizadas de bactérias encapsuladas em matriz polimérica extracelular auto-produzida que

adere a superfícies bióticas e abióticas. Este biofilme fornece proteção contra antibióticos e contra o sistema imune do hospedeiro e também promove o aumento da resistência ao estresse (CRAFT *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Manifestações clínicas ocasionadas por infecções de *Staphylococcus aureus*

Origem da infecção	Doença
Pele e tecido mole	Impetigo, furúnculos, carbúnculos, abscessos, celulite, fasciite, piomiosite, infecções em feridas cirúrgicas e traumáticas
Intravascular	Bacteremia, sepse, tromboflebite séptica, cardite infecciosa
Ossos e articulações	Osteomielite séptica, artrite séptica
Trato respiratório	Pneumonia, empiema, sinusite, otite média
Outras infecções invasivas	Meningite, infecção de espaço cirúrgico
Doença mediada por toxina	Choque tóxico estafilocócico, intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada estafilocócica, impetigo bolhoso, pneumonia necrosante, osteomielite necrosante

Fonte: Zurita *et al.* (2010).

As taxas de infecção por *S. aureus* em Unidades de Terapia Intensiva (UTI's) são preocupantes e o risco de infecção aumenta com a duração da permanência do paciente nessas unidades (CRAFT *et al.*, 2019). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2019), ao analisarem a distribuição dos microrganismos causadores de infecções primárias de corrente sanguínea com confirmação laboratorial (IPCLS) em UTI's no Brasil, identificaram que a *S. aureus* causou 15% das infecções em UTI adulto, 11,3% em UTI pediátrica e 11,9% em UTI neonatal, estando atrás apenas da *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN) e *Klebsiella pneumoniae*. Quando fizeram a avaliação da frequência de fenótipos resistentes a antibióticos entre os cocos Gram-positivos, constatou-se que 57,5% em UTI adulto, 40,7% em UTI pediátrica e 36,4% em UTI neonatal, eram resistentes ao antibiótico oxacilina.

O tratamento das infecções por *S. aureus* depende do tipo de infecção, idade do paciente, manifestação clínica da doença, co-morbilidade, susceptibilidade antibacteriana da infecção, organismo e hospitalização. Antibióticos como agente único e combinações de antibióticos têm sido utilizados para tratar as infecções por esta espécie (GNANAMANI; HARIHARAN; SATYASEELA, 2017).

Desde o final dos anos 80, tem havido déficit na descoberta de novas classes químicas de drogas antimicrobianas para combater infecções estafilocócicas (FOSTER, 2017), por isso, os esforços de pesquisa para oferecer novos antibióticos eficazes para os pacientes precisam ser estimulados, para que as consequências da atual falta de opções terapêuticas antimicrobianas sejam resolvidas (PAPHITOU, 2013).

3.4 Características do gênero *Trichoderma*

Entre milhares de gêneros fúngicos, o *Trichoderma* é um daqueles com maior impacto sobre a humanidade. Algumas espécies são conhecidas como produtores industriais de enzimas e proteínas recombinantes, outras como produtoras de metabólitos secundários, por exemplo, aroma de coco e outros são utilizados como agentes de biocontrole (KUBICEK; KOMON-ZELAZOWSKA; DRUZHININA, 2008).

Pertencem ao filo Ascomycota, ordem Hypocrales, família Hypocreaceae, sendo comumente encontrados no solo, principalmente na rizosfera das plantas (HARMAN *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2014). Também podem ser encontrados em material vegetal em decomposição e raramente são associados com doenças de plantas vivas (SRIVASTAVA *et al.*, 2014).

Em alguns casos, podem ser patógenos humanos oportunistas, podendo ser isolados do efluente peritoneal de pacientes em diálise, infecções de receptores de transplantes imunocomprometidos, pacientes que sofrem de leucemia, abscessos cerebrais e HIV. As espécies patogênicas incluem *Hypocrea orientalis*, *T. citrinoviride* Bissett, bem como *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*, com a prevalência das duas primeiras espécies estreitamente relacionadas (DRUZHININA *et al.*, 2008).

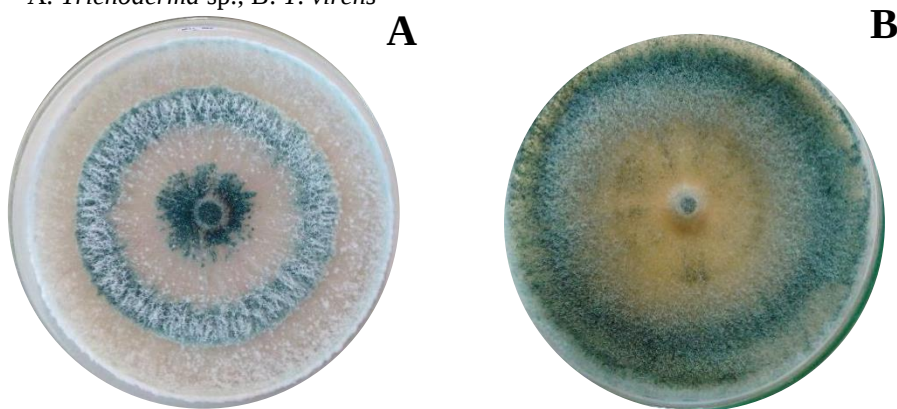
A nomenclatura destes fungos é complicada devido ao seu pleomorfismo, ou seja, alguns podem existir sob duas fases morfológica e fisiologicamente distintas. A fase sexual (teleomorfo) é conhecida pelo nome genérico *Hypocrea*, enquanto que na fase assexual (anamorfo ou mitospórico) é chamado de *Trichoderma* (SRIVASTAVA *et al.*, 2014). Até 2015, a Subcomissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH) listava 256 espécies pertencendo a este gênero (<http://www.isth.info/trichoderma/>).

Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. tornaram-se componentes predominantes da microbiota do solo de diferentes ecossistemas, como campos agrícolas, pastagens, florestas, pântanos salgados, pradarias e desertos, em uma ampla gama de zonas climáticas, o que se deve tanto à utilização eficiente do substrato, quanto à sua capacidade para secretar

antibióticos e enzimas. Geralmente apresentam esporos de coloração verde, mas podem variar de incolor até cinza ou marrom (FIGURA 2). Algumas espécies produzem um aroma de coco devido a um composto volátil biologicamente ativo nomeado 6-pentil- α -pirona, que tem sido relatado como antifúngico e promotor de crescimento de plantas (KUBICEK; KOMON-ZELAZOWSKA; DRUZHININA, 2008; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; ZEILINGER *et al.*, 2016).

Figura 2 - Colônias de *Trichoderma* cultivadas em meio Batata-Dextrose-Ágar.

A: *Trichoderma* sp.; B: *T. virens*



Fonte: A autora (2019).

3.4.1 Compostos bioativos

Várias espécies de *Trichoderma* são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal devido a sua versatilidade de ação, além de atuarem como indutores de resistência das plantas contra doenças (MACHADO *et al.*, 2012). No micoparasitismo ocorre uma cascata de ações, como reconhecimento, contato, adesão, competição e expressão de antifúngicos (GELLEN *et al.*, 2014). Acredita-se que sua extensa capacidade de micoparasitismo possa estar relacionada à grande variedade de metabólitos secundários produzidos por eles (BRITO *et al.*, 2014).

Estes fungos possuem vários genes que estão envolvidos nos mecanismos de biocontrole, os quais podem codificar diversos compostos, entre eles: enzimas que inibem a síntese de proteína e DNA dos patógenos, consequentemente inibindo seu crescimento; enzimas degradadoras da parede celular de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*; trichodermina, um metabólito com atividade antifúngica contra fitopatógenos e patógenos humanos; entre outros metabólitos, todos envolvidos no biocontrole ou no fornecimento de alguma vantagem ambiental à planta (SRIVASTAVA *et al.*, 2014).

Muitos trabalhos relatam a atividade antifúngica de *Trichoderma* contra os fitopatógenos *R. solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. ampelinum*, *Rhizopus* sp., *S. rolfsii* e *Verticillium dahliae*, entre outros (ISAIAS *et al.*, 2014; LEELAVATHI; VANI; REENA, 2014; SHENTU *et al.*, 2014). As espécies *T. harzianum*, *T. virens* e *T. viride* já são comercializadas como agentes de controle biológico (BCAs) contra fitopatógenos (SHI *et al.*, 2012).

Além da conhecida atividade antifúngica contra fitopatógenos, *Trichoderma* spp. é eficaz contra fungos patogênicos ao homem, como *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Cladosporium shaerospermum*, *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus* (TIJERINO *et al.*, 2011; MOREIRA, 2013; SADYKOVA *et al.*, 2015).

Recentemente, também foi relatada atividade antitumoral contra células de carcinoma hepatocelular por peptaibols produzidos por *T. pseudokoningii*, que levaram à ativação da via da apoptose dessas células (SHI *et al.*, 2010). Os peptaibols são peptídeos derivados do metabolismo dos fungos, e variam de 4-21 resíduos de aminoácidos aproximadamente. Embora suas atividades biológicas tenham sido parcialmente esclarecidas, atividades antimicrobianas e citotóxicas foram relatadas para várias dessas substâncias. Esses compostos podem ser produzidos por outros fungos, porém os *Trichoderma* são responsáveis por 80% das inscrições no banco de dados “*Comprehensive Peptaibiotics Database*” (ZEILINGER *et al.*, 2016).

A produção de compostos antibacterianos também tem sido frequentemente descrita para espécies de *Trichoderma* e podem ser classificadas em: i) metabólitos voláteis e de baixo peso molecular, incluindo compostos aromáticos simples, alguns poliquetideos, terpenos voláteis e metabólitos de isociano, sendo todas substâncias relativamente não polares; ii) metabólitos de alto peso molecular, como os peptaibols, que podem exercer sua atividade por meio de interações direta entre o *Trichoderma* e seu antagonista (TIJERINO *et al.*, 2011). Entre os compostos não voláteis também estão a gliotoxina e a gliovirina (PHUPIEUKHAM *et al.*, 2015).

No Brasil, Guedes (2011) obteve extratos etanólicos a partir do caldo de cultivo em BD de *T. stromaticum*, inibindo várias bactérias Gram-positivas e obtendo concentração inibitória mínima de 15,63 µg/mL contra *S. aureus*. Quando esta linhagem de *Trichoderma* foi cultivada em meio líquido malte 2%, a concentração inibitória mínima obtida para a mesma bactéria foi de 62,50 µg/mL, valor bastante superior, assim como para os outros patógenos testados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Garbin (2011), que cultivou *Trichoderma* sp. nos meios BDA e Sabouraud e o testou contra patógenos bacterianos. Este fungo produziu compostos anti-*Staphylococcus* em ambos os meios, com halos de inibição que variaram de 6 a 10 mm.

Moreira (2013) isolou *Trichoderma* sp. de folhas de *Araucaria angustifolia* e realizou extração etanólica a partir de seu cultivo em meio BDA. Este extrato apresentou ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*. No mesmo ano, Ishii *et al.* (2013) relataram o isolamento e elucidação da estrutura de um novo composto antimicrobiano chamado citosporona S a partir de *Trichoderma* sp., que mostrou ação efetiva contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e alguns fungos.

Pires *et al.* (2015) isolaram fungos endofíticos de três espécies de cactos da caatinga brasileira e testaram seu potencial antibacteriano contra bactérias patogênicas ao homem. Destes, os fungos do gênero *Trichoderma* alcançaram os melhores resultados, sendo a espécie *T. longibrachiatum* considerada a mais promissora, pois inibiu sete dos dez patógenos testados, incluindo *S. aureus*.

Narendran e Kathiresan (2016) relataram a atividade antimicrobiana de *Trichoderma* sp. isolado da rizosfera de *Rhizophora annamalayana*, em um manguezal de Pichavaram (Índia). Seu extrato foi capaz de inibir *S. aureus* (CIM= 150 µg/mL), *E. coli* (CIM= 125 µg/mL) e *Bacillus cereus* (CIM= 150 µg/mL), além de duas bactérias patogênicas para peixes.

Com todos esses estudos, fica evidente o potencial de fungos do gênero *Trichoderma* para a produção de compostos bioativos, tanto para a área agrícola, quanto para a área medicinal. Devendo, portanto, serem estudados mais frequentemente a fim de obter novas biomoléculas.

3.5 Propriedades da bananeira (*Musa* spp.)

A bananeira é uma planta tropical, cujo fruto é um dos mais populares do mundo (PARASHAR; SHARMA; GARG, 2014). Existem várias variedades de banana, as quais diferem entre si apenas no seu arranjo de ploidia e a maioria dos taxonomistas atualmente parece concordar que pode ser dado um único nome científico a todas as bananas comestíveis: *Musa* spp. (PEREIRA; MARASCHIN, 2015). A maioria das cultivares de bananeira originaram-se no Sudoeste do Continente Asiático a partir de duas espécies diplóides, *Musa acuminata* Colla (AA) e *Musa balbisiana* Colla (BB). Assim, a evolução da bananeira ocorreu em quatro etapas (SILVA; NETO, 2012):

- 1) A espécie *M. acuminata* (AA) e *M. balbisiana* (BB) cruzaram e deram origem a indivíduos AB;
- 2) Ocorrência de partenocarpia (formação de frutos sem fecundação) por mutação em indivíduos AA e AB;
- 3) Gametas femininos não reduzidos de indivíduos AA e BB partenocárpicos recebendo pólen A ou B com a formação de triploides AAA, AAB e ABB;
- 4) Cruzamentos envolvendo gametas masculinos haploides (N) e femininos triploides (3N), com a formação de indivíduos AAAA, AAAB, AABB e ABBB. Dessa forma, existem cultivares dos seguintes grupos genômicos: AA, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB.

Entre as principais cultivares de bananeiras no Brasil estão a Maçã, a Prata e a Pacovan, todas possuindo o genótipo AAB (SILVA; NETO, 2012). Nas regiões Norte e Nordeste a cultivar mais consumida é a do tipo Prata e nas regiões Sul e Sudeste são a Nanica e a Nanicao (ALMEIDA, 2012).

Algumas partes da bananeira (*Musa* spp.) têm sido utilizadas na medicina local e tradicional na América, Ásia, Oceania, Índia e África, como raízes, pseudocaules, caules, folhas e flores (PEREIRA; MARASCHIN, 2015). Algumas doenças podem ser naturalmente combatidas pelo consumo de banana, como a anemia (através do estímulo da produção de hemoglobina), pressão arterial (por ser rica em potássio, mas pobre em sal, torna-se uma boa opção no combate a pressão arterial) e depressão (a banana possui triptofano, o qual é convertido em serotonina e gera sensação de prazer e bem estar) (EHIOWEMWENGUAN; EMOGHENE; INETIANBOR, 2014).

Estudos já foram realizados visando comprovar as aplicações medicinais de todas as partes da bananeira: as flores possuem atividade antimicrobiana, antihiperglicêmica e antioxidante (JAWLA; KUMAR; KHAN, 2012; PADAM *et al.*, 2012); as folhas possuem atividade antibacteriana contra *E. coli* (VALARMATHY *et al.*, 2010; KARUPPIAH; MUSTAFFA, 2013), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoneae*, *S. aureus*, entre outras, além de exibir atividade antioxidante (KARUPPIAH; MUSTAFFA, 2013); as raízes são utilizadas em distúrbios digestivos; a mucilagem de suas sementes é administrada em casos de catarro e diarreia na Índia (ABIODUN-SOLANKE; FALADE, 2010).

3.5.1 Casca de banana

A casca de banana é fonte de amido (3%), proteína bruta (6-9%), gordura bruta (3,8-11%), fibra dietética total (43,2-49,7%), ácidos graxos poli-insaturados, pectina, aminoácidos essenciais (leucina, valina, fenilalanina e treonina) e micronutrientes (DEBABANDYA; SABYASACHI; NAMRATA, 2010). Podem ser encontrados flavonóides, taninos, alcalóides, glicosídeos e terpenóides, os quais apresentam vários efeitos biológicos e farmacológicos, tais como: atividades antibacterianas, anti-hipertensivas, antidiabéticas e anti-inflamatórias. Por isso, a presença dessas substâncias nas cascas de banana sugere que elas possuem um valioso potencial medicinal (BAHADAR *et al.*, 2014).

Na medicina tradicional brasileira, ela é conhecida por promover a cicatrização de feridas, principalmente aquelas causadas por queimaduras (PEREIRA; MARASCHIN, 2015). Considerando este conhecimento tradicional, Lino *et al.* (2011) avaliaram a propriedade cicatrizante e antimicrobiana de uma preparação tópica à base de extrato de *M. sapientum* em feridas cirúrgicas na pele de ratos. A cicatrização de feridas tratadas com o gel à base do extrato da banana foi mais rápida quando comparada com os grupos controle e placebo, além disso este gel inibiu o crescimento de bactérias piogênicas e enterobactérias nas feridas. Dessa forma, concluíram que o extrato de *M. sapientum* possui propriedades curativas e antimicrobianas (*in vivo*), possivelmente devido aos taninos.

Nos últimos anos, alguns trabalhos publicados relataram a existência de atividade antimicrobiana de cascas de banana, como o de Karadi *et al.* (2011), que obtiveram extratos a partir da casca da banana (*M. paradisiaca*) com diclorometano e metanol, os quais inibiram bactérias Gram-positivas (incluindo *S. aureus*) e negativas, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *A. niger*.

A partir de extrato aquoso de cascas de banana frescas, Chabuck *et al.* (2013) detectaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e negativas, obtendo halo de inibição de 30 mm contra *S. aureus*. Trabalhando com outras formas de extração, Ehiowemwenguan *et al.* (2014) obtiveram extratos aquosos e etanólicos a partir do pó da casca de banana (*M. sapientum*) e testaram sua atividade antibacteriana, observando que seus extratos etanólicos obtiveram melhores resultados, inibindo todos os patógenos testados. A concentração inibitória mínima do extrato etanólico para *S. aureus* foi de 512,5 mg/mL e concentração bactericida mínima >1025 mg/mL, enquanto o extrato aquoso não foi capaz de inibir este patógeno.

Recentemente, Asoso, Akharaiyi e Animba (2016) obtiveram extratos do pó da casca da banana (*M. paradisiaca*) com metanol, etanol e acetona e testaram sua atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar. Os extratos metanólicos e etanólicos inibiram todos os patógenos testados, incluindo *S. aureus*, cujos halos de inibição foram de 22 e 17 mm, respectivamente. A concentração inibitória mínima de ambos os extratos foi de 200 mg/mL para *S. aureus*, demonstrando que o tamanho do halo de inibição pode não ter relação com a concentração do composto antibacteriano.

Assim, observa-se que este resíduo alimentício possui potencial para o isolamento de compostos antibióticos, pois mesmo quando são utilizadas diferentes formas de extração ou escolhidas espécies/variedades diferentes de bananas, a inibição dos patógenos é relatada.

CAPÍTULO I

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Trichoderma* spp.
CONTRA *Staphylococcus aureus***

RESUMO

A busca por novas substâncias antimicrobianas tem se intensificado nos últimos anos devido à contínua necessidade de combater patógenos humanos resistentes. Os fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por serem produtores de compostos eficientes contra fitopatógenos, podendo também ser hábeis na produção de outros biocompostos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de *Trichoderma* spp. contra *Staphylococcus aureus*. Inicialmente foi realizado um *screening* com 98 linhagens de *Trichoderma* spp. e nove cepas de *S. aureus* pelo método do bloco de gelose, em seguida os fungos foram divididos em quatro grupos através de análise de *cluster* dos resultados, sendo escolhido um fungo de cada grupo para o cultivo em meio líquido sob diferentes condições para avaliação da influência destas condições na produção de antibacterianos. Após o período de crescimento, os filtrados foram obtidos e testados contra os patógenos em microplacas de 96 poços. Os seis filtrados mais promissores foram selecionados para identificação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição e determinação da concentração bactericida mínima (CBM). A seguir realizou-se cromatografia em camada delgada, bioautografia e teste de citotoxicidade. Das 98 culturas testadas no método do bloco de gelose, 58 inibiram uma ou mais cepas de *S. aureus*. Após este teste, os fungos foram agrupados por similaridade de seus resultados, sendo selecionados os fungos *Trichoderma* sp. CFAM 0194, *Trichoderma* sp. CFAM 0234, *Trichoderma* sp. CFAM 0767 e *T. harzianum* CFAM 1155. Estes fungos produziram diversos filtrados com ação antibacteriana, sendo possível notar a influência das condições de cultivo (meio, pH e luminosidade) para produção de antibacterianos. Essa influência foi mais evidente para o fungo *T. harzianum* CFAM 1155, pois no teste do bloco de gelose este fungo inibiu apenas três patógenos e ao ser cultivado em diferentes condições produziu vários filtrados capazes de inibir todos os patógenos. Entre os seis filtrados avaliados no teste de CIM e CBM, os dois mais promissores foram obtidos do cultivo de *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, pH 5,0, ausência de luz e BD, pH 5,0, muita luz, porém, este último obteve os menores valores de CIM e CBM. Os seis melhores filtrados também foram submetidos à cromatografia em camada delgada, a qual revelou perfis cromatográficos semelhantes para os filtrados obtidos do mesmo fungo, o que pode sugerir que foram produzidos os mesmos compostos. Ao realizar-se teste de citotoxicidade com os três melhores filtrados contra células VERO, notou-se que estes não são citotóxicos nas concentrações necessárias para inibir ou matar as cepas de *S. aureus*. Assim, nota-se que os fungos do gênero *Trichoderma* sp. produzem compostos eficientes na inibição de *S. aureus*, porém as condições de cultivo para produção desses compostos precisa ser escolhida de forma a favorecer a síntese de antibacterianos. Além disso, os filtrados mais promissores não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações necessárias para inibir ou matar as cepas de *S. aureus*.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Biomoléculas fúngicas. *Screening*. Metabólitos microbianos.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm fornecido uma grande variedade de moléculas bioativas com diferentes aplicações medicinais. Alguns dos produtores promissores de biocompostos são os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, cuja produção de antimicrobianos vem sendo descrita de 1934 até os dias atuais (PHUPIEWKHAM *et al.*, 2015). Estes fungos produzem cerca de 200 compostos com efeitos antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, nematicidas e citotóxicos, ocupando papel importante na agricultura, medicina e indústria (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SZABÓ *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; SADYKOVA *et al.*, 2015).

Entre os compostos voláteis produzidos por eles estão etileno, cianeto de hidrogênio, álcoois, monoterpenos, aldeídos e cetonas até o comprimento de cadeia C₄, e no grupo dos compostos não voláteis estão os peptaibols e gliotoxina, dicetopiperaziniana e gliovirina (SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998).

No geral, estima-se que estes fungos sejam capazes de produzir mais de 1000 compostos (ZEILINGER *et al.*, 2016). Apesar dessa capacidade, normalmente o interesse das pesquisas realizadas com *Trichoderma* visa o desenvolvimento do mercado de produtos agrícolas, principalmente no controle de fitopatógenos. Porém, é necessário que sejam desenvolvidas pesquisas relacionadas à produção de outros tipos de biocompostos.

Sendo assim, a busca por antibacterianos provenientes de *Trichoderma* é necessária e possui grande chance de sucesso, principalmente de espécies provenientes da Amazônia, cuja biodiversidade é consideravelmente alta, aumentando assim a probabilidade de detecção de novos compostos.

2 METODOLOGIA

2.1 Material biológico

2.1.1 Seleção e reativação das culturas de *Trichoderma*

Foram selecionadas 98 culturas de *Trichoderma* cedidas pela Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, pertencente à Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz-Amazônia (Tabela 1). Estas foram reativadas em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sendo incubadas à temperatura ambiente por sete dias.

Tabela 1 - Culturas de *Trichoderma* selecionadas para avaliação de atividade antibacteriana

Espécie	Nº de registro da cultura	Local de isolamento
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 036	Solo Cigs* - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 043	Água Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 046	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 058	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 073	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0149	Água Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0194	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0199	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0227	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0229	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0235	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>T. koningiopsis</i>	CFAM 0251	Ar Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0252	Ar Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0253	Ar Cigs - Manaus/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 0255	Ar Cigs - Manaus/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 0256	Ar Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0320	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>T. koningii</i>	CFAM 0358	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0387	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0415	Água Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0418	Água Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0419	Água Cigs - Manaus/AM
<i>T. koningii</i>	CFAM 0422	Água Cigs - Manaus/AM
<i>T. viride</i>	CFAM 0441	Água Cigs - Manaus/AM
<i>T. koningii</i>	CFAM 0442	Água Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0450	Água Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0471	Água Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0676	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0678	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0767	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0768	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0792	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>T. koningii</i>	CFAM 0810	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 0837	Solo Cigs - Manaus/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1135	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1136	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1137	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM

Continua...

Espécie	Nº de registro da cultura	Local de isolamento
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1139	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1140	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1141	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1142	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1143	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1144	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1145	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1148	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1149	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1151	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1155	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1157	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1161	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1162	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1163	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1164	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1165	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1166	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1171	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1172	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1174	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. virens</i>	CFAM 1176	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1178	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1181	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1182	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. koningiopsis</i>	CFAM 1184	Solo Reserva Mamirauá - Tefé/AM
<i>T. reesei</i>	CFAM 1204	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1210	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1213	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1215	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. koningiopsis</i>	CFAM 1217	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1218	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1219	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. koningiopsis</i>	CFAM 1221	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. atroviride</i>	CFAM 1223	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1224	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1227	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. lixii</i>	CFAM 1229	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1232	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. atroviride</i>	CFAM 1233	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>T. harzianum</i>	CFAM 1236	Água Município Rural de Serra Baixa - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1297	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1298	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1299	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1300	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1301	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1302	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1303	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1304	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1305	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1306	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1373	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1374	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1375	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1376	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1377	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1378	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1379	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM

Continua...

Espécie	Nº de registro da cultura	Local de isolamento
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1380	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1381	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM
<i>Trichoderma</i> sp.	CFAM 1382	Água Município Rural do Lago do Limão - Iranduba/AM

*Cigs: Centro de Instrução de Guerra na Selva

2.1.2 Reativação e manutenção de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas nove cepas de *S. aureus* provenientes de amostras clínicas cedidas pela Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM (Tabela 2), pertencente à Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz-Amazônia. Após o experimento de triagem (bloco de gelose), também foi utilizada uma cepa ATCC 80958 cedida gentilmente pela Dra. Patrícia Nogueira da Plataforma de Bioensaios da Fiocruz-Amazônia. Para o processo de reativação, todas as cepas foram inoculadas em meio ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 24h. Estas condições de cultivo também foram utilizadas para a manutenção dos patógenos durante os experimentos.

Tabela 2 - Culturas clínicas de *Staphylococcus aureus* utilizadas para realização dos testes antibacterianos

Espécie	Nº de registro da cultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	CBAM 0274
	CBAM 0318
	CBAM 0319
	CBAM 0320
	CBAM 0321
	CBAM 0323
	CBAM 0325
	CBAM 0326
	CBAM 0327

2.2 Avaliação da atividade antibacteriana

2.2.1 Ensaio em meio sólido (Método do bloco de gelose)

A atividade antibacteriana dos isolados foi inicialmente avaliada qualitativamente em meio sólido pelo “Método do Bloco de Gelose” (ICHIKAWA; ISHIKURA; OZAKI, 1971), visando selecionar os microrganismos produtores de moléculas antibióticas. Inicialmente as culturas de *Trichoderma* foram cultivadas em meio BDA, por sete dias a 28 °C e, após esse

período, foram retirados três fragmentos de ± 8 mm de diâmetro em forma circular (*plug*) de cada cultura, para que a seguir fossem depositados sobre os patógenos.

Paralelamente, os patógenos foram inoculados em placas com ágar Mueller-Hinton e incubados a 37 °C por até 24h, das quais foram retiradas colônias isoladas para o preparo da suspensão celular em solução salina 0,85%, cuja turbidez era semelhante à coluna 0,5 da escala de McFarland (correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A partir desta suspensão celular, foram retirados 150 μ L e semeados com auxílio de *swab* na superfície de meio de cultura ágar Mueller-Hinton. Em seguida, os *plugs* das colônias de *Trichoderma* foram depositados na superfície destas placas. O controle positivo consistiu na aplicação de discos de papel de filtro contendo cloranfenicol (5 mg/mL) no centro das placas. O controle do meio de cultivo foi realizado inoculando-se somente blocos de ágar de BDA sobre os microrganismos teste. Todas as placas foram incubadas a 37 °C por 24h.

A avaliação consistiu na determinação da presença/ausência de halos de inibição e medição dos mesmos. Os resultados deste experimento foram submetidos à análise de *cluster* no *software* R versão 3.4.3 para agrupamento dos fungos por similaridade de seus resultados.

2.2.2 Cultivo em meio líquido

A partir da análise de *cluster* foram selecionados quatro fungos para o cultivo em meio líquido em diferentes condições. Eles foram inoculados em três meios, três pHs e três condições de luminosidade (intensidade de luz medida pelo aparelho Li 25 AA, com sensor de luz Quantum Li-Cor (Q41358)), sendo estas condições combinadas por planejamento fatorial (Tabela 3). Dessa forma foi possível avaliar a influência das condições de cultivos testadas para a produção de antibacterianos e determinar qual destas condições é a ideal para cada fungo.

Os fungos foram inoculados em meio BDA e incubados à temperatura ambiente por sete dias. Após esse período, 5 mL de água destilada estéril foram adicionados à placa de Petri, formando uma suspensão de micélio e esporos. A seguir, esta suspensão foi agitada em vórtex e levada para contagem em câmara Neubauer, sendo determinada a inoculação de 1×10^6 esporos/mL em cada Erlenmeyer contendo 100 mL do meio de cultivo (SHENTU *et al.*, 2013, com adaptações). Os fungos foram mantidos em agitador rotatório sob 28 °C e agitação contínua de 150 rpm, por sete dias.

Tabela 3 - Condições de cultivo utilizadas no cultivo submerso de *Trichoderma* spp. selecionados

Meio de cultura	Luminosidade	pH	Temperatura (°C)	Velocidade de agitação (rpm)
BD ¹	Ausência de luz	5,0	28	150
Farelo de trigo ²	Ausência de luz	5,0	28	150
BD	Muita luz ⁴	5,0	28	150
Farelo de trigo	Muita luz	5,0	28	150
BD	Ausência de luz	7,0	28	150
Farelo de trigo	Ausência de luz	7,0	28	150
BD	Muita luz	7,0	28	150
Farelo de trigo	Muita luz	7,0	28	150
YES ³	Com luz ⁵	6,0	28	150
YES	Com luz	6,0	28	150
YES	Com luz	6,0	28	150
YES	Com luz	6,0	28	150

¹Merck, ²60 g farelo de trigo do tipo grosso, 20 g dextrose, 1000 mL água destilada (Elaborado pela autora), ³20 g extrato de levedura, 150 g sacarose, 1000 mL água destilada (SOUZA, 2014), ⁴ 3,42 PAR (7,6 watts.m⁻²) ⁵ 1,30 PAR (2,89 watts.m⁻²)

Após o período de incubação foi realizada a separação da massa micelial do sobrenadante através de filtração simples em gaze estéril. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado em membrana *Millipore* 0,22 µm para assegurar a pureza dos mesmos. Estes foram armazenados em *freezer* a -18 °C até a realização dos testes.

2.2.3 Teste antibacteriano em microplaca de 96 poços

O teste de atividade antibacteriana geralmente é realizado em placas de Petri, em meio sólido, assim como o teste do bloco de gelose realizado anteriormente. Porém, visando economizar material e tempo, foi elaborada a metodologia utilizada neste trabalho, no qual o teste antibacteriano é realizado em microplacas de 96 poços. Para este teste utilizou-se como base a metodologia proposta pelo documento M07-A9 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012), que normatiza o teste de microdiluição.

2.2.3.1 Suspensão celular do patógeno

Inicialmente foram preparadas as suspensões celulares dos patógenos, cultivando-os em caldo Mueller-Hinton por ±24h a 37 °C. Alíquotas deste cultivo foram retiradas para leitura em espectrofotômetro para medição da densidade ótica a 600 nm, realizando-se ou não diluições do inóculo com caldo Mueller-Hinton, a fim de se obter uma turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (1x10⁸ UFC/mL), ou seja, com um valor de absorbância compreendido entre 0,08 – 0,1.

Após esse procedimento, foi realizada nova diluição em caldo Mueller-Hinton até que fosse alcançada a concentração $2,5 \times 10^6$ UFC/mL. Sendo assim, ao inocular-se 20 μ L da suspensão no poço-teste a concentração de patógeno foi de 5×10^4 UFC/poço, que é a concentração indicada pelo CLSI.

2.2.3.2 Preparo das microplacas

Este teste foi preparado visando leitura posterior do crescimento em leitor de microplacas (Bio Rad iMark™). Por isso a montagem do teste consistiu em poços contendo o branco e poços-teste contendo os filtrados (FIGURA 1 e Tabela 4).

Em todos os poços-teste foram adicionados 50 μ L de caldo Mueller-Hinton, 50 μ L do filtrado e 20 μ L da suspensão celular do patógeno ($2,5 \times 10^6$ UFC/mL), em triplicata. Nos poços contendo o branco foram adicionados 70 μ L de caldo Mueller-Hinton e 50 μ L do filtrado. Foi utilizada uma microplaca para realização dos controles do solvente (água), de crescimento do patógeno, de esterilidade do meio e controle positivo (cloranfenicol 30 μ g/mL). As microplacas foram incubadas em estufa do tipo BOD a 37 °C por 24h, realizando-se a leitura do crescimento bacteriano em leitor de microplacas Bio Rad iMark™, em comprimento de onda de 595 nm. Os resultados obtidos nesse teste foram submetidos a análise estatística descritiva (desvio padrão e média) e ANOVA, com nível de significância de 5%. As médias diferentes foram analisadas por meio do Teste de Tukey, utilizando-se o programa Minitab 18.

Conforme citado no tópico 2.1.2, a partir deste teste os filtrados passaram a ser testados também contra a cepa ATCC 80958 de *S. aureus*. Dessa forma, o número total de patógenos passou a ser dez.

Figura 1 - Método de inoculação em microplacas de 96 poços para determinação da atividade antibacteriana dos filtrados de *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes condições de cultivo

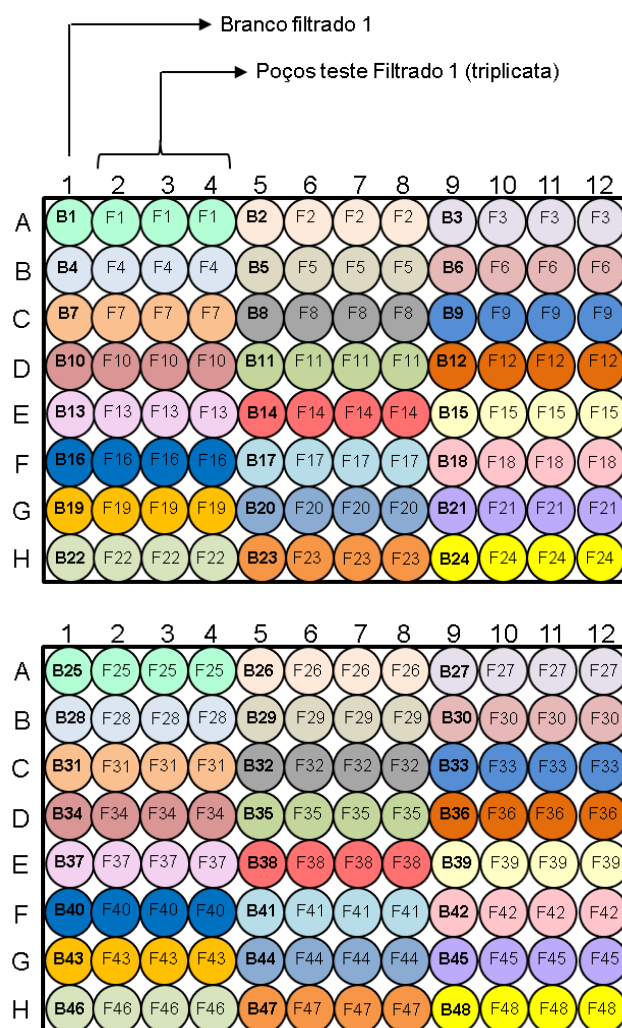


Tabela 4 - Esquema de preenchimento dos poços das microplacas

	Branco Teste	Teste	Branco Solvente	Controle Solvente	Branco Controle positivo	Controle positivo
Caldo Mueller-Hinton	70 µL	50 µL	70 µL	50 µL	70 µL	50 µL
Filtrado	50 µL	50 µL	-	-	-	-
Patógeno	-	20 µL	-	20 µL	-	20 µL
Água destilada	-	-	50 µL	50 µL	-	-
Antibiótico	-	-	-	-	50 µL	50 µL

2.2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM é considerada a menor concentração de uma amostra capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo (valor de absorbância 0,05). Esta foi determinada pelo método de microdiluição para os seis filtrados com melhores resultados no teste antibacteriano em microplaca, seguindo as recomendações do CLSI (2012), documento M07-A9, com adaptações para realização de leitura espectrofotométrica.

2.2.4.1 Preparo dos filtrados

Inicialmente, os filtrados foram liofilizados, pesados e ressuspensos em água destilada esterilizada até obter-se a concentração de 10 mg/mL. Dessa forma, após a diluição seriada obteve-se sete diluições testadas (referentes a linha A até G): 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 e 0,078 mg/mL. Porém, em alguns casos foram testadas outras concentrações, maiores ou menores, dependendo dos resultados obtidos.

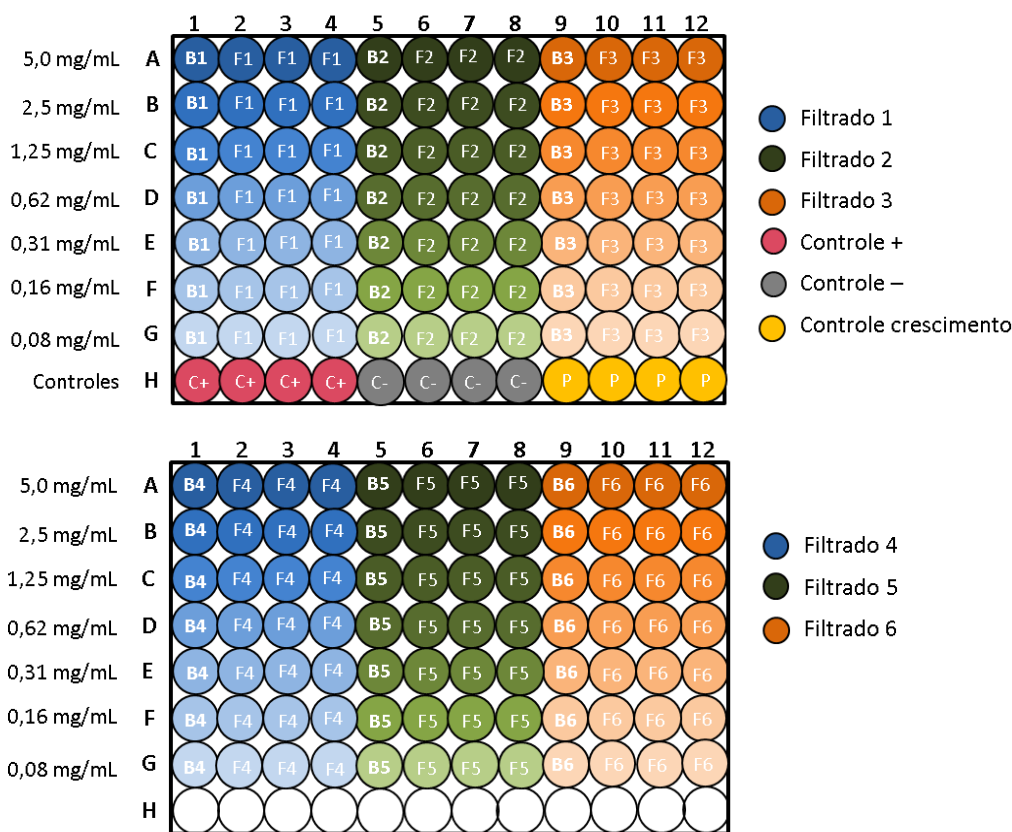
2.2.4.2 Preparo das microplacas

Em microplacas de 96 poços foram distribuídos 100 µL de caldo Mueller-Hinton em todos os poços da linha A até G. Na linha A da placa foram adicionados 100 µL dos filtrados em quadruplicata (um poço referente ao branco e três poços-teste). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até alcançar a linha G.

As colunas 1, 5 e 9 foram referentes ao branco de cada filtrado, em cada uma das concentrações testadas. As colunas 2-4, 6-8, 10-12 eram referentes aos poços-teste, que após a diluição passaram a ter 100 µL resultantes da mistura de meio de cultura (CMH) e filtrado. Nestes poços-teste foram inoculados 20 µL da suspensão celular do patógeno preparada da mesma forma citada no tópico 2.2.3.1. Assim, cada poço da microplaca ficou com o volume total de 120 µL (FIGURA 2).

A linha H foi utilizada como controle, sendo realizados controle positivo (cloranfenicol 30 µg/mL), controle negativo (solvente) e controle de crescimento do patógeno. Após esse processo, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24h, sendo então realizada a leitura de absorbância ótica no aparelho Bio Rad iMarkTM em comprimento de onda de 595 nm.

Figura 2 - Método de inoculação em microplacas para determinação da Concentração Inibitória Mínima



2.2.5 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é a menor concentração de antibacteriano que mata pelo menos 99,9% do inóculo microbiano. Este teste foi realizado com base nos resultados obtidos no teste de CIM, utilizando-se como inóculo as suspensões originárias dos poços-teste das microplacas em que foi verificada a ausência de crescimento microbiano durante a leitura espectrofotométrica. Placas de Petri com meio ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com 20 µL de inóculo dos poços citados e incubadas a 37 °C por 24h (FABRIS, 2017). A CBM foi considerada como a menor concentração dos filtrados em que não houve crescimento microbiano sobre o ágar Mueller-Hinton.

2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD) e Bioautografia

Os mesmos filtrados utilizados no teste de CIM e CBM foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) e bioautografia. Em cada placa de CCD, o filtrado foi aplicado com auxílio de capilar. As placas foram secas a temperatura ambiente e em

seguida colocadas em uma cuba de vidro previamente saturada com o eluente da fase móvel (acetato de etila/ácido acético (9:1)). A cuba foi fechada para saturação da placa de CCD e eluição do solvente. Após esse processo, as placas foram secas e reveladas com revelador físico: luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm (revelador para duplas ligações conjugadas) e reveladores químicos: vapores de iodo (substâncias contendo ligações duplas), reagente de Dragendorff (alcaloides, compostos nitrogenados heterocíclicos e aminas quaternárias), cloreto férrico (substâncias aromáticas) e anisaldeído férrico (para terpenos). Após a revelação das placas foi medida a distância percorrida por cada composto e calculado o fator de retenção (R_f) de cada um utilizando a fórmula abaixo, onde D refere-se à distância percorrida.

$$R_f = \frac{D \text{ produto}}{D \text{ solvente}}$$

Para determinação da atividade antibacteriana por bioautografia, 20 mL de ágar Mueller-Hinton a $\pm 40^\circ\text{C}$, suplementados com 500 μL de suspensão celular do patógeno *S. aureus* ATCC 80958 na escala 0,5 de McFarland e 500 μL da solução indicadora Cloreto de Trifeniltetrazolium (TTC) a 1,0%, foi vertido na cromatoplaça acondicionada em placa de Petri (120 mm x 9 mm). Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. Em seguida, foram avaliadas as bandas responsáveis pela inibição do patógeno.

2.4 Teste de citotoxicidade *in vitro*

2.4.1 Cultivo celular

A linhagem VERO foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), e penicilina (50 $\mu\text{g/mL}$). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

2.4.2 Amostras selecionadas e concentrações testadas

Foram utilizados os três filtrados com melhores resultados nos testes de CIM e CBM; dois deles foram provenientes do cultivo de *Trichoderma* sp. CFAM 0767 e um do cultivo de *T. harzianum* CFAM 1155. As concentrações selecionadas para o teste de citotoxicidade

foram baseadas nos testes de CIM e CBM, a partir dos quais foram identificados os valores necessários para inibir (CIM) e/ou matar (CBM) as *S. aureus* utilizadas (Tabela 5).

Tabela 5. Concentrações dos filtrados utilizados no teste de citotoxicidade contra células VERO

Filtrado	Concentrações (mg/mL)
<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 BD, ausência de luz, pH 5,0	0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0
<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 BD, muita luz, pH 5,0	0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0
<i>T. harzianum</i> CFAM 1155 BD, ausência de luz, pH 5,0	0,23; 0,47; 0,94; 1,87; 3,75; 7,5

2.4.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Foi utilizada a linhagem VERO (ATCC® CCL-81™), adquirida a partir da *American Type Culture Collection*. Os ensaios foram determinados pelo método Alamar Blue de acordo com Ahmed *et al.* (1994). As células foram inoculadas na concentração de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e tratadas com as amostras de *Trichoderma* spp. nas concentrações que variaram de 7,5 mg/mL a 0,16 mg/mL (Tabela 5). As placas foram mantidas em incubadora de CO₂ por 24 horas a 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período adicionou-se 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20) em cada poço e esperou-se o tempo de metabolização de 2 horas do Alamar blue® (Sigma-Aldrich, Brasil). A fluorescência foi monitorada em leitor de microplaca (GloMax® Explorer) comprimento de onda de emissão 580-640 nm e excitação 520. Como controle positivo foi utilizado o crescimento celular; como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1%. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula: %Viabilidade= $F_t \times 100 / F_b$, onde F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e F_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

Os dados de viabilidade celular foram representados em gráfico em função da concentração do filtrado, assim foram traçadas as curvas de viabilidade celular e visualizado o índice de citotoxicidade IC₅₀, o qual representa a concentração da amostra que lesa ou provoca a morte de 50% da população celular no ensaio em comparação ao controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste do bloco de gelose

As linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste teste de triagem incluem as espécies *T. lixii* (1), *T. reesei* (1), *T. viride* (1), *T. atroviride* (2), *T. koningii* (4), *T. koningiopsis* (4), *T. harzianum* (10) e *T. virens* (11), além de 64 linhagens identificadas apenas por *Trichoderma* sp. Do total, 58 inibiram uma ou mais das cepas de *S. aureus* testadas, com diferentes halos de inibição (FIGURA 3 e Tabela 6). Todas as culturas de *T. virens* produziram antibacterianos (CFAM 0255, 0256, 1137, 1161, 1166, 1174, 1176, 1143, 1144, 1148 e 1157), inibindo diferentes números de patógenos. E entre as linhagens de *T. harzianum* apenas uma (CFAM 1165) não inibiu nenhum dos patógenos.

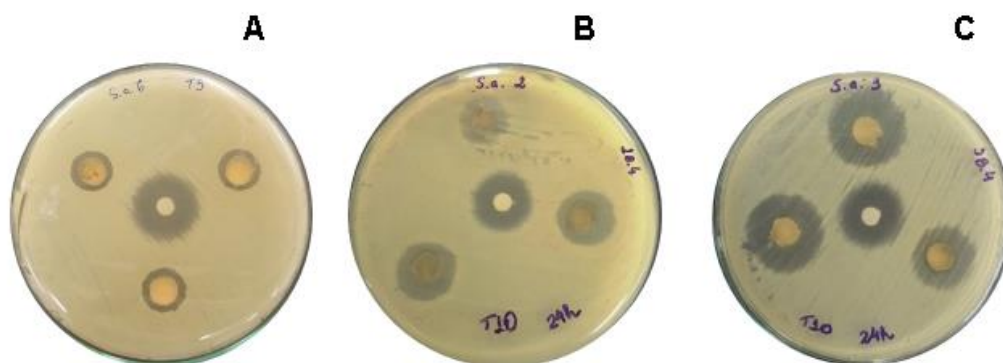
Tabela 6 - Resultados do teste do bloco de gelose de *Trichoderma* spp. contra *Staphylococcus aureus*

Fungo	Patógeno - <i>Staphylococcus aureus</i>								
	CBAM 0274	CBAM 0318	CBAM 0319	CBAM 0320	CBAM 0321	CBAM 0323	CBAM 0325	CBAM 0326	CBAM 0327
	-----Halos de inibição (mm)-----								
<i>T. atroviride</i> - CFAM 1223	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. atroviride</i> - CFAM 1233	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1139	2,94	2,78	0,0	2,43	0,0	2,96	2,34	2,30	3,85
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1155	0,0	3,54	3,73	0,0	0,0	5,10	0,0	0,0	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1165	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1172	4,21	3,00	5,45	7,77	7,08	8,37	6,39	7,29	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1210	2,23	2,31	2,50	1,33	1,57	2,09	2,45	2,41	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1213	2,43	0,0	0,0	0,0	0,0	2,27	0,0	0,0	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1218	0,0	0,0	2,48	0,0	0,0	2,55	2,68	0,0	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1224	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,58	0,0	0,0	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1227	2,30	2,21	2,24	2,00	1,95	2,82	1,99	2,02	0,0
<i>T. harzianum</i> - CFAM 1236	2,48	0,0	0,0	0,0	0,0	2,23	2,33	0,0	0,0
<i>T. koningii</i> - CFAM 0358	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. koningii</i> - CFAM 0422	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. koningii</i> - CFAM 0442	3,95	0,0	0,0	2,78	4,49	6,02	2,91	2,74	0,0
<i>T. koningii</i> - CFAM 0810	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. koningiopsis</i> - CFAM 0251	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. koningiopsis</i> - CFAM 1184	2,54	0,0	0,0	2,44	2,48	2,63	2,56	1,97	3,96
<i>T. koningiopsis</i> - CFAM 1217	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. koningiopsis</i> - CFAM 1221	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. lixii</i> - CFAM 1229	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,34	0,0	0,0	0,0
<i>T. reesei</i> - CFAM 1204	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,50	0,0	0,0	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 0255	0,0	5,78	7,24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 0256	0,0	0,0	2,14	0,0	0,0	2,45	0,0	0,0	0,0

Fungo	Patógeno - <i>Staphylococcus aureus</i>								
	CBAM 0274	CBAM 0318	CBAM 0319	CBAM 0320	CBAM 0321	CBAM 0323	CBAM 0325	CBAM 0326	CBAM 0327
	-----Halos de inibição (mm)-----								
<i>T. virens</i> - CFAM 1137	1,89	0,0	2,01	2,03	2,22	2,13	2,05	2,21	1,77
<i>T. virens</i> - CFAM 1143	1,67	0,0	0,0	2,28	2,21	0,0	2,76	2,34	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 1144	0,0	1,89	2,02	0,0	0,0	3,34	0,0	0,0	3,78
<i>T. virens</i> - CFAM 1148	0,0	0,0	0,0	2,86	2,80	3,14	2,74	2,99	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 1157	2,66	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,33	0,0	5,15
<i>T. virens</i> - CFAM 1161	0,0	2,66	2,51	0,0	0,0	3,94	0,0	0,0	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 1166	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,78	0,0	2,24	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 1174	2,37	0,0	0,0	3,57	0,0	0,0	3,16	4,11	0,0
<i>T. virens</i> - CFAM 1176	0,0	0,0	0,0	2,00	2,25	0,0	2,03	2,31	0,0
<i>T. viride</i> - CFAM 0441	5,22	0,0	0,0	2,80	4,63	6,13	2,87	2,92	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 036	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 043	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 046	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 058	2,34	0,0	0,0	2,54	2,33	0,0	2,58	4,24	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 073	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,85	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0149	0,0	2,36	1,70	0,0	0,0	1,21	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0194	6,63	8,28	8,15	3,00	4,36	8,83	4,96	4,29	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0199	0,0	2,92	2,80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,63
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0227	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0229	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0235	7,01	6,7	5,74	2,82	6,31	7,17	2,37	2,73	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0252	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0253	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0320	1,79	0,0	0,0	0,0	0,0	2,63	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0387	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,88	2,25	2,29	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0415	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0418	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0419	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0450	0,0	0,0	2,23	0,0	0,0	2,55	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0471	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,23	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0676	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0678	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0767	2,90	4,07	3,98	0,0	0,0	4,79	2,87	0,0	3,94
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0768	1,88	0,0	0,0	2,33	2,09	3,75	2,08	1,99	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0837	4,79	3,00	4,06	2,78	4,05	5,16	3,94	3,33	4,32
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1135	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,46
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1136	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fungo	Patógeno - <i>Staphylococcus aureus</i>								Continua...
	CBAM	CBAM	CBAM	CBAM	CBAM	CBAM	CBAM	CBAM	CBAM
	0274	0318	0319	0320	0321	0323	0325	0326	0327
	-----Halos de inibição (mm)-----								
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 0792	2,88	0,0	0,0	2,83	2,56	5,72	0,0	4,52	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1140	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1141	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1142	2,98	0,0	0,0	2,88	3,11	5,38	0,0	0,0	3,21
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1145	0,0	0,0	0,0	3,15	3,09	2,66	0,0	3,25	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1149	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 1151	2,45	0,0	0,0	2,44	2,57	3,34	2,73	2,92	3,40
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1158	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1162	0,0	0,0	0,0	2,44	2,36	3,89	2,38	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1163	2,73	2,36	0,0	2,55	2,57	3,16	2,44	2,01	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1164	2,23	2,47	0,0	0,0	3,21	2,09	2,22	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1171	2,46	0,0	0,0	2,24	2,34	0,0	2,37	2,39	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1181	5,16	0,0	0,0	2,10	1,92	0,0	2,23	2,21	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1182	1,96	0,0	0,0	2,33	2,38	0,0	2,92	3,96	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1215	0,0	0,0	0,0	2,98	2,52	2,72	2,64	2,55	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1219	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp.- CFAM 1232	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1297	0,0	3,29	4,37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1298	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1299	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1300	0,0	3,23	2,64	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1301	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1302	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1303	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1304	0,0	3,96	6,76	0,0	0,0	2,70	0,0	0,0	4,99
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1305	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1306	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1373	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1374	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1375	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1376	5,74	6,28	4,77	2,90	5,89	5,00	2,70	2,73	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1377	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1378	2,72	2,95	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,81
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1379	4,78	7,96	6,49	7,34	6,61	8,32	7,06	8,02	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1380	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,01
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1381	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma</i> sp. - CFAM 1382	4,87	6,23	4,49	2,60	2,71	6,96	2,88	2,83	0,0

Figura 3 – Diferentes tamanhos de halos de inibição de *Trichoderma* spp. contra *Staphylococcus aureus*. A: *T. harzianum* CFAM 1218 contra CBAM 0323; B: *T. virens* CFAM 0255 contra CBAM 0318; C: *T. virens* CFAM 0255 contra CBAM 0319. No centro da placa disco controle contendo antibiótico cloranfenicol



Os resultados obtidos neste teste para as cepas de *T. atroviride* (CFAM 1223 e 1233) estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores, os quais relataram a ausência de atividade antibacteriana para esta espécie (SADYKOVA *et al.*, 2015). Já as espécies *T. harzianum* (CFAM 1139, 1155, 1172, 1210, 1213, 1218, 1224, 1227 e 1236) e *T. viride* (CFAM 0441), ao contrário, foram bem sucedidas neste teste e já tiveram suas atividades anti-*Staphylococcus* relatadas na literatura por diversos autores (LEELAVATHI *et al.*, 2014; PHUPIEWKHAM *et al.*, 2015; SADYKOVA *et al.*, 2015; SAAD, 2016; ANWAR; IQBAL, 2017).

Todas as linhagens de *T. virens* inibiram ao menos dois patógenos. Apesar deste potencial, poucos artigos foram publicados recentemente com esta espécie contra patógenos humanos. Saleh *et al.* (2011) relataram que o extrato bruto obtido do cultivo de *T. virens* em meio CYS80 inibiu *S. aureus*, com halo de inibição de 10 mm.

Outras espécies, como *T. koningii* e *T. koningiopsis*, apresentaram resultados diferentes, nos quais apenas uma cultura de cada espécie (CFAM 0442 e CFAM 1184, respectivamente) produziu antibacterianos. Isso pode acontecer devido à diferenças genéticas e metabólicas individuais entre os microrganismos ou mesmo devido à condição de cultivo testada (RAMOS; SAID, 2011). Sadykova *et al.* (2015) relataram a atividade antibacteriana de *T. koningii*, obtendo halos de até 26 mm contra *S. aureus*.

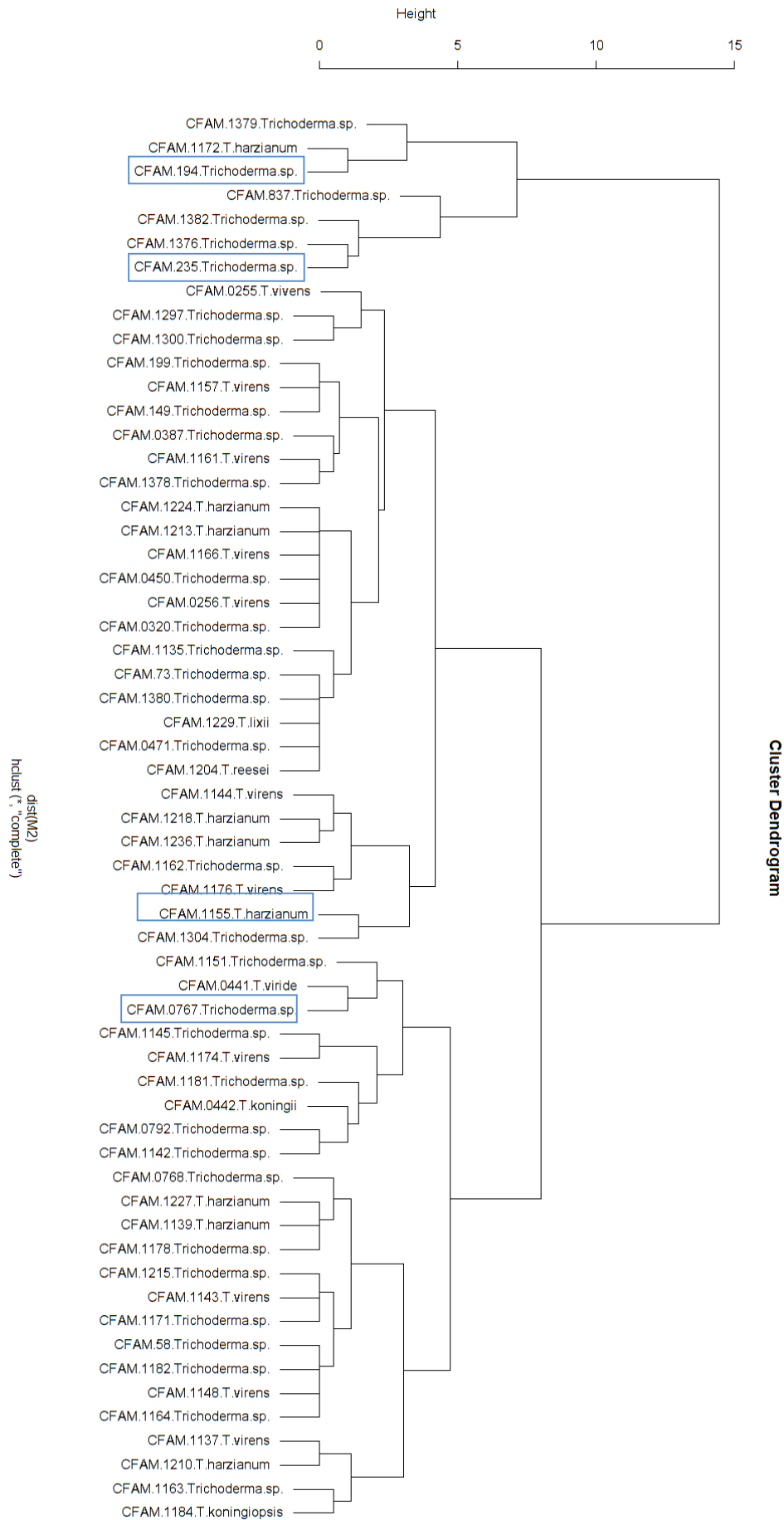
Conforme a Figura 3 e Tabela 6, os fungos utilizados neste trabalho apresentaram diversos tamanhos de halos de inibição contra as nove cepas de *S. aureus*. Porém, apesar de halos maiores aparentarem maior inibição do patógeno, o tamanho do halo depende do peso molecular do composto antibacteriano e de sua velocidade de difusão no meio de cultura.

Além disso, a ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente a ausência de atividade antibacteriana da amostra testada, e sim que a difusão pode não ter sido

completa, especialmente para os compostos menos polares que se difundem mais lentamente no meio de cultura (BONA *et al.*, 2014). Por isso, para a continuidade dos trabalhos, não necessariamente foram selecionados os fungos que apresentaram maiores halos. Em vez disso, os dados dos halos obtidos (tamanho e quantidade de bactérias inibidas) foram submetidos à análise de *cluster*, que dividiu os fungos em quatro grandes blocos de acordo com a similaridade de seus resultados (FIGURA 4).

De cada um dos grupos foi selecionado um fungo para cultivo em meio líquido, sendo: *Trichoderma* sp. CFAM 0194, *Trichoderma* sp. CFAM 0235, *Trichoderma* sp. CFAM 0767 e *T. harzianum* CFAM 1155. Assim, foi possível verificar a influência das condições de cultivo na produção de antibacterianos através de teste em microplacas, que por não depender da difusão do antibacteriano e fornecer resultados quantitativos, é mais preciso e reproduzível.

Figura 4 - Resultado da análise de *cluster* dos resultados obtidos nos testes de bloco de gelose



3.2 Teste antibacteriano em microplacas utilizando os filtrados de *Trichoderma* spp.

Apesar dos testes em ágar serem os mais utilizados e terem como vantagem uma avaliação simples pela visualização do halo de inibição, eles são métodos trabalhosos no que se refere ao preparo das placas e inoculação dos inóculos microbianos. Já o teste de microdiluição, gera uma economia de espaço, meio de cultura e reagentes, além de possibilitar a obtenção de dados quantitativos (BONA *et al.*, 2014). Por isso, foi elaborada uma metodologia de avaliação antibacteriana baseada na metodologia de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços.

Os filtrados obtidos do cultivo em meio líquido dos fungos selecionados foram testados contra nove cepas clínicas de *S. aureus* e uma cepa ATCC 80958 em microplacas de 96 poços. O uso do filtrado puro, sem a extração dos compostos antibacterianos com solventes, ocorreu visando-se dispensar a etapa de extração dos 48 filtrados (12 de cada fungo), reduzindo tempo e custo financeiro.

Os resultados deste foram submetidos à análise estatística, sendo analisado cada fungo e cada patógeno separadamente, para que dessa forma fosse possível identificar quais as melhores condições de cultivo para cada linhagem para a produção dos antibacterianos.

A cultura de *Trichoderma* sp. depende da quantidade de inóculo, do pH, da velocidade de agitação e da composição do meio, os quais influenciam sobre a morfologia desse microrganismo. Na verdade, a morfologia micelial relaciona-se ao desempenho das culturas submersas, afetando principalmente a produtividade de metabólitos (AHAMED; VERMETTE, 2009). De fato, as alterações nas condições de cultivo influenciaram positiva ou negativamente na produção de antibacterianos para os quatro fungos testados (Tabelas 7-10).

Tabela 7 - Crescimento bacteriano das cepas de *Staphylococcus aureus* em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0194 expresso em valores de absorbância (595 nm)

Filtrado (Condições de cultivo)	Patógeno - <i>Staphylococcus aureus</i>									
	CBAM 0274	CBAM 0318	CBAM 0319	CBAM 0320	CBAM 0321	CBAM 0323	CBAM 0325	CBAM 0326	CBAM 0327	ATCC 80958
BD, ausência de luz, pH 5,0	0,057 ^{D,E}	0,022 ^E	0,079 ^E	0,001 ^E	0,06 ^{D,E}	0,021 ^E	0,182 ^E	0,009 ^F	0,001 ^G	0,072 ^{C,D,E}
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0	0,003 ^F	0,006 ^E	0,005 ^{F,G}	0,005 ^E	0,003 ^F	0,005 ^E	0,004 ^F	0,0 ^F	0,006 ^G	0,006 ^{E,F}
BD, muita luz, pH 5,0	0,187 ^C	0,02 ^E	0,261 ^A	0,049 ^D	0,015 ^{E,F}	0,008 ^E	0,302 ^C	0,012 ^F	0,198 ^{D,E}	0,071 ^{D,E}
Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0	0,0 ^F	0,001 ^E	0,0 ^G	0,0 ^E	0,0 ^F	0,006 ^E	0,0 ^F	0,01 ^F	0,007 ^G	0,0 ^F
BD, ausência de luz, pH 7,0	0,238 ^B	0,23 ^C	0,038 ^F	0,114 ^C	0,121 ^C	0,007 ^E	0,151 ^E	0,142 ^E	0,167 ^E	0,206 ^A
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0	0,198 ^{B,D}	0,008 ^E	0,009 ^{F,G}	0,0 ^E	0,149 ^C	0,011 ^E	0,293 ^C	0,044 ^F	0,327 ^C	0,179 ^{A,B}
BD, muita luz, pH 7,0	0,348 ^A	0,405 ^A	0,008 ^{F,G}	0,178 ^B	0,232 ^B	0,001 ^E	0,424 ^A	0,212 ^D	0,023 ^G	0,231 ^A
Farelo de trigo, muita luz, pH 7,0	0,039 ^{E,F}	0,01 ^E	0,007 ^{F,G}	0,009 ^E	0,006 ^F	0,005 ^E	0,013 ^F	0,0 ^F	0,002 ^G	0,002 ^F
YES, com luz, pH 6,0	0,208 ^{B,C}	0,407 ^A	0,147 ^{B,C}	0,221 ^A	0,16 ^C	0,2 ^B	0,239 ^D	0,225 ^D	0,384 ^B	0,113 ^{B,C,D}
YES, com luz, pH 6,0	0,196 ^{B,C}	0,327 ^B	0,090 ^{D,E}	0,076 ^D	0,324 ^A	0,082 ^D	0,392 ^{A,B}	0,413 ^B	0,227 ^D	0,175 ^{A,B}
YES, com luz, pH 6,0	0,207 ^{B,C}	0,233 ^C	0,118 ^{C,D}	0,07 ^D	0,245 ^B	0,13 ^C	0,279 ^{C,D}	0,286 ^C	0,235 ^D	0,138 ^{B,C}
YES, com luz, pH 6,0	0,201 ^{B,C}	0,443 ^A	0,161 ^B	0,124 ^C	0,208 ^B	0,299 ^A	0,355 ^B	0,464 ^A	0,464 ^A	0,14 ^B
Controle CMH	0,09 ^D	0,156 ^D	0,08 ^E	0,047 ^D	0,067 ^D	0,073 ^D	0,264 ^{C,D}	0,447 ^{A,B}	0,091 ^F	0,219 ^A

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os filtrados do fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0194 apresentaram dois tipos de influência para os patógenos. Alguns apresentaram o resultado esperado, de inibição do patógeno; outros, por outro lado, mostraram-se nutritivos para os patógenos. O meio de cultivo YES geralmente é utilizado para estimular o fungo a produzir compostos bioativos devido ao possível estresse causado pelo excesso de açúcar (sacarose), mas neste trabalho quase todos os filtrados obtidos do cultivo dos quatro *Trichoderma* em YES favoreceram o crescimento dos patógenos. Em alguns casos estes cresceram mais na presença do filtrado oriundo do YES do que mesmo no controle (bactéria em caldo Mueller-Hinton) (Tabelas 7-10).

O fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0194 inibiu oito, das nove bactérias testadas no bloco de gelose, deixando de inibir apenas a CBAM 0327 (Tabela 6). No teste antibacteriano em microplacas, este fungo produziu cinco filtrados capazes de inibir este patógeno. Quando cultivado em meio Farelo de trigo com pH 5,0, o fungo não apresentou preferência por nenhuma das condições de luminosidade. Porém, quando cultivado em Farelo de trigo com pH 7,0, só produziu compostos antibacterianos na presença de muita luz. Ao ser cultivado em BD com pH 5,0 este fungo produziu antibacterianos eficientes contra CBAM 0327 apenas na ausência de luz e quando cultivado em BD com pH 7,0, este fungo só produziu antibacterianos na presença de muita luz (Tabela 7).

No geral, as melhores condições de cultivo para a produção de antibacterianos por *Trichoderma* sp. CFAM 0194 foi Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0 e Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0. Ambos foram classificados como os melhores estatisticamente para todos os patógenos. Nota-se que as estas duas condições de cultivo diferem apenas quanto à luminosidade a que o fungo foi exposto.

Assim como a composição nutricional e o pH podem interferir na produção de metabólitos, Leite (2012) afirmou que a luminosidade e as interações entre estes fatores influenciam no metabolismo fúngico. Dessa forma, a luz pode induzir a mudanças morfológicas e fisiológicas, o que justificaria os resultados obtidos nesta pesquisa.

Tabela 8 - Crescimento bacteriano das cepas de *Staphylococcus aureus* em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0235 expresso em valores de absorbância (595 nm)

Filtrados (condições de cultivo)	Patógeno – <i>Staphylococcus aureus</i>									
	CBAM 0274	CBAM 0318	CBAM 0319	CBAM 0320	CBAM 0321	CBAM 0323	CBAM 0325	CBAM 0326	CBAM 0327	ATCC 80958
BD, ausência de luz, pH 5,0	0,004 ^D	0,004 ^E	0,0 ^E	0,006 ^D	0,003 ^D	0,004 ^D	0,002 ^E	0,008 ^E	0,006 ^F	0,012 ^D
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0	0,0 ^D	0,008 ^E	0,001 ^E	0,002 ^D	0,006 ^D	0,0 ^D	0,004 ^E	0,004 ^E	0,005 ^F	0,0 ^D
BD, muita luz, pH 5,0	0,001 ^D	0,008 ^E	0,008 ^E	0,003 ^D	0,008 ^D	0,008 ^D	0,01 ^E	0,009 ^E	0,009 ^F	0,014 ^D
Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0	0,003 ^D	0,007 ^E	0,004 ^E	0,0 ^D	0,0 ^D	0,0 ^D	0,005 ^E	0,006 ^E	0,008 ^F	0,0 ^D
BD, ausência de luz, pH 7,0	0,005 ^D	0,01 ^E	0,01 ^E	0,001 ^D	0,001 ^D	0,01 ^D	0,012 ^E	0,01 ^E	0,004 ^F	0,004 ^D
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0	0,007 ^D	0,05 ^E	0,0 ^E	0,003 ^D	0,009 ^D	0,009 ^D	0,014 ^E	0,008 ^E	0,035 ^F	0,011 ^D
BD, muita luz, pH 7,0	0,004 ^D	0,0 ^E	0,008 ^E	0,007 ^D	0,006 ^D	0,028 ^D	0,008 ^E	0,002 ^E	0,013 ^F	0,0 ^D
Farelo de trigo, muita luz, pH 7,0	0,015 ^D	0,004 ^E	0,004 ^E	0,004 ^D	0,008 ^D	0,011 ^D	0,002 ^E	0,0 ^E	0,014 ^F	0,002 ^D
YES, com luz, pH 6,0	0,582 ^A	0,459 ^C	0,448 ^B	0,58 ^B	0,281 ^B	0,391 ^B	0,431 ^C	0,675 ^C	0,443 ^C	0,24 ^{B,C}
YES, com luz, pH 6,0	0,604 ^A	0,549 ^B	0,345 ^C	0,498 ^C	0,376 ^A	0,479 ^A	0,453 ^{B,C}	0,63 ^C	0,371 ^D	0,315 ^A
YES, com luz, pH 6,0	0,513 ^B	0,568 ^B	0,5 ^B	0,623 ^B	0,357 ^A	0,386 ^B	0,502 ^B	0,765 ^B	0,528 ^B	0,333 ^A
YES, com luz, pH 6,0	0,643 ^A	0,686 ^A	0,619 ^A	0,78 ^A	0,376 ^A	0,472 ^A	0,613 ^A	0,869 ^A	0,603 ^A	0,3 ^{A,B}
Controle CMH	0,09 ^C	0,156 ^D	0,08 ^D	0,047 ^D	0,067 ^C	0,073 ^C	0,264 ^D	0,447 ^D	0,091 ^E	0,219 ^C

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No teste do bloco de gelose, o fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0235 inibiu oito patógenos, com exceção da CBAM 0327 (Tabela 6). Após ser cultivado em diferentes condições, este fungo produziu compostos eficientes contra este patógeno nas condições testadas, com exceção do meio YES, com luz, pH 6,0. Os filtrados obtidos deste cultivo foram nutrientes para todos os patógenos, até mesmo mais que o caldo de cultivo Mueller-Hinton (Tabela 8).

Todos os filtrados que apresentaram ação antibacteriana não diferiram estatisticamente entre si. Porém, para o teste de CIM e CBM foram selecionados os filtrados obtidos de Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0, Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0 e Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Tabela 9 - Crescimento bacteriano das cepas de *Staphylococcus aureus* em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0767 expresso em valores de absorbância (595 nm)

Filtrados (condições de cultivo)	Patógeno – <i>Staphylococcus aureus</i>									
	CBAM 0274	CBAM 0318	CBAM 0319	CBAM 0320	CBAM 0321	CBAM 0323	CBAM 0325	CBAM 0326	CBAM 0327	ATCC 80958
BD, ausência de luz, pH 5,0	0,008 ^F	0,001 ^G	0,008 ^D	0,002 ^C	0,002 ^D	0,008 ^E	0,002 ^D	0,003 ^D	0,005 ^F	0,004 ^E
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0	0,201 ^D	0,17 ^{D,E}	0,191 ^B	0,025 ^C	0,152 ^B	0,007 ^E	0,379 ^A	0,314 ^B	0,152 ^{C,D}	0,07 ^{C,D}
BD, muita luz, pH 5,0	0,002 ^F	0,001 ^G	0,007 ^D	0,0 ^C	0,0 ^D	0,0 ^E	0,003 ^D	0,002 ^D	0,009 ^F	0,002 ^E
Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0	0,177 ^D	0,1 ^F	0,2 ^B	0,006 ^C	0,164 ^B	0,001 ^E	0,186 ^C	0,154 ^C	0,118 ^{C,D,E}	0,048 ^{C,D,E}
BD, ausência de luz, pH 7,0	0,009 ^F	0,013 ^G	0,01 ^D	0,01 ^C	0,004 ^D	0,024 ^E	0,01 ^D	0,007 ^D	0,008 ^F	0,019 ^{D,E}
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0	0,215 ^{C,D}	0,233 ^{B,C}	0,29 ^A	0,203 ^B	0,173 ^{A,B}	0,185 ^C	0,302 ^B	0,233 ^{B,C}	0,098 ^{D,E}	0,107 ^C
BD, muita luz, pH 7,0	0,007 ^F	0,003 ^G	0,004 ^D	0,011 ^C	0,002 ^D	0,0 ^E	0,008 ^D	0,0 ^D	0,007 ^F	0,011 ^{D,E}
Farelo de trigo, muita luz, pH 7,0	0,288 ^{A,B}	0,191 ^{D,E}	0,028 ^D	0,305 ^A	0,147 ^B	0,006 ^D	0,295 ^B	0,306 ^B	0,088 ^E	0,316 ^A
YES, com luz, pH 6,0	0,317 ^A	0,249 ^B	0,258 ^A	0,25 ^B	0,189 ^{A,B}	0,016 ^E	0,283 ^B	0,246 ^B	0,312 ^A	0,247 ^B
YES, com luz, pH 6,0	0,254 ^{B,C}	0,181 ^{D,E}	0,291 ^A	0,25 ^B	0,226 ^A	0,302 ^A	0,283 ^B	0,295 ^B	0,29 ^{A,B}	0,247 ^B
YES, com luz, pH 6,0	0,28 ^{A,B}	0,195 ^{C,D}	0,199 ^B	0,22 ^B	0,148 ^B	0,194 ^C	0,269 ^B	0,439 ^A	0,235 ^B	0,2 ^B
YES, com luz, pH 6,0	0,282 ^{A,B}	0,309 ^A	0,201 ^B	0,357 ^A	0,183 ^{A,B}	0,238 ^B	0,433 ^A	0,432 ^A	0,173 ^C	0,227 ^B
Controle CMH	0,09 ^E	0,156 ^E	0,08 ^C	0,047 ^C	0,067 ^C	0,073 ^D	0,264 ^B	0,447 ^A	0,091 ^E	0,219 ^B

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0767 inibiu seis patógenos no teste do bloco de gelose, não tendo ação antibacteriana contra CBAM 0320, 0321 e 0326 (Tabela 6). No teste antibacteriano em microplacas, apenas o filtrado obtido do cultivo deste fungo em BD, muita luz, pH 5,0 inibiu CBAM 0320. Contra o patógeno CBAM 0321 este fungo produziu quatro filtrados eficientes: BD, ausência de luz, pH 7,0, BD, ausência de luz, pH 5,0; BD, muita luz, pH 7,0 e BD, muita luz, pH 5,0, estes mesmos filtrados foram os mais eficientes contra CBAM 0326 (Tabela 9).

O filtrado obtido do cultivo em BD, ausência de luz, pH 5,0 esteve entre os melhores estatisticamente para todos os patógenos testados. Além dele, o filtrado obtido de BD, muita luz, pH 5,0 também se destacou, estando entre os melhores filtrados obtidos de *Trichoderma* sp. CFAM 0767 para todos os patógenos. Por isso, esses dois filtrados foram selecionados para os testes de CIM e CBM.

Tabela 10 - Crescimento bacteriano das cepas de *Staphylococcus aureus* em condições normais (controle) e frente aos filtrados do fungo *Trichoderma harzianum* CFAM 1155 expresso em valores de absorbância (595 nm)

Filtrados (condições de cultivo)	Patógeno – <i>Staphylococcus aureus</i>									
	CBAM 0274	CBAM 0318	CBAM 0319	CBAM 0320	CBAM 0321	CBAM 0323	CBAM 0325	CBAM 0326	CBAM 0327	ATCC 80958
BD, ausência de luz, pH 5,0	0,002 ^F	0,006 ^E	0,002 ^F	0,0 ^E	0,0 ^D	0,002 ^C	0,0 ^D	0,023 ^E	0,023 ^E	0,005 ^C
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0	0,006 ^F	0,004 ^E	0,002 ^F	0,003 ^E	0,002 ^D	0,002 ^C	0,006 ^D	0,001 ^E	0,004 ^E	0,003 ^C
BD, muita luz, pH 5,0	0,017 ^F	0,009 ^E	0,002 ^F	0,005 ^E	0,007 ^D	0,003 ^C	0,0 ^D	0,007 ^E	0,0 ^E	0,023 ^C
Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0	0,002 ^F	0,0 ^E	0,002 ^F	0,0 ^E	0,003 ^D	0,002 ^C	0,003 ^D	0,006 ^E	0,0 ^E	0,008 ^C
BD, ausência de luz, pH 7,0	0,499 ^A	0,188 ^{C,D}	0,006 ^F	0,0 ^E	0,004 ^D	0,0 ^C	0,012 ^D	0,152 ^D	0,001 ^E	0,421 ^A
Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0	0,019 ^F	0,0 ^E	0,0 ^F	0,002 ^E	0,05 ^C	0,0 ^C	0,171 ^C	0,006 ^E	0,132 ^C	0,032 ^C
BD, muita luz, pH 7,0	0,0 ^F	0,0 ^E	0,09 ^{D,E}	0,007 ^E	0,057 ^C	0,0 ^C	0,166 ^C	0,137 ^D	0,01 ^E	0,058 ^C
Farelo de trigo, muita luz, pH 7,0	0,0 ^F	0,002 ^E	0,001 ^F	0,0 ^E	0,003 ^D	0,005 ^C	0,0 ^D	0,0 ^E	0,0 ^E	0,002 ^C
YES, com luz, pH 6,0	0,333 ^B	0,344 ^A	0,323 ^A	0,335 ^A	0,183 ^A	0,203 ^A	0,243 ^B	0,40 ^B	0,317 ^A	0,222 ^B
YES, com luz, pH 6,0	0,227 ^C	0,191 ^C	0,118 ^{C,D}	0,26 ^B	0,17 ^{A,B}	0,197 ^A	0,231 ^B	0,29 ^C	0,208 ^B	0,217 ^B
YES, com luz, pH 6,0	0,227 ^C	0,173 ^{C,D}	0,128 ^C	0,19 ^C	0,142 ^B	0,199 ^A	0,160 ^C	0,311 ^C	0,191 ^B	0,226 ^B
YES, com luz, pH 6,0	0,18 ^D	0,227 ^B	0,280 ^B	0,354 ^A	0,151 ^B	0,219 ^A	0,335 ^A	0,314 ^C	0,223 ^B	0,203 ^B
Controle CMH	0,09 ^E	0,156 ^D	0,08 ^E	0,047 ^D	0,067 ^C	0,073 ^B	0,264 ^B	0,447 ^A	0,091 ^D	0,219 ^B

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No caso do fungo *T. harzianum* CFAM 1155, a influência das condições de cultivo foi a mais evidente. No teste do bloco de gelose, este inibiu apenas três patógenos (CBAM 0318, 0319 e 0323) (Tabela 6). Ao ser cultivado em diferentes condições, este fungo produziu vários filtrados capazes de inibir todos os patógenos (Tabela 10). Apesar disso, os filtrados obtidos do cultivo em YES foram nutritivos para quase todos os patógenos.

Este fungo não apresentou especificidade em relação a luminosidade quando cultivado em Farelo de trigo ou BD com pH 5,0. O mesmo resultado não foi observado nos filtrados obtidos de seu cultivo em meio Farelo de trigo com pH 7,0 e BD com pH 7,0, pois não apresentaram um padrão frente aos patógenos.

Após análise estatística alguns filtrados destacaram-se, entre eles o BD, ausência de luz, pH 5,0, Farelo de trigo ausência de luz, pH 5,0, BD, muita luz, pH 5,0, Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0 e Farelo de trigo, muita luz, pH 7,0, os quais inibiram todos os patógenos testados. Do cultivo de *T. harzianum* CFAM 1155 foi selecionado o filtrado obtido do cultivo em BD, ausência de luz, pH 5,0 para os testes de CIM e CBM.

O meio de cultivo selecionado para a produção de compostos bioativos é muito importante, pois precisa satisfazer os requisitos para a produção desses metabólitos (ANWAR; IQBAL, 2017). Além da composição do meio de cultivo, Suryanarayanan *et al.* (2009) ressaltaram a importância de estudar o espectro de metabólitos secundários de fungos sob diferentes condições de crescimento, o que poderia alterar o perfil do metabólito secundário e até mesmo induzir a síntese de novos metabólitos.

Analisando os resultados obtidos a partir do cultivo de *Trichoderma* sp. CFAM 0194, *Trichoderma* sp. CFAM 0235, *Trichoderma* sp. CFAM 0767 e *T. harzianum* CFAM 1155, observou-se que não houve uma única condição de cultivo que seja a ideal para todos estes fungos. Porém, na condição de cultivo BD, muita luz, pH 5,0 três destes fungos (CFAM 0235, 0767 e 1155) produziram antibacterianos eficazes contra todos os patógenos e na condição Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0 três destes fungos (CFAM 0194, 0767 e 1155) também produziram antibacterianos eficazes contra todos os patógenos.

Os resultados obtidos dos filtrados provenientes de diferentes condições de meio, luminosidade e pH mostraram que as condições testadas influenciaram na produção de antibacterianos por fungos do gênero *Trichoderma*.

Alguns trabalhos obtiveram resultados semelhantes ao investigar a influência das condições de cultivo na produção de metabólitos de fungos. Garbin (2011) cultivou

Trichoderma sp. nos meios BDA e Sabouraud e os testou contra patógenos bacterianos. Quando cultivado em BDA este fungo inibiu apenas *S. aureus* e quando cultivado em Sabouraud inibiu *S. aureus*, *E. coli* e uma cepa MRSA. Demonstrando, assim, a importância da escolha do meio de cultivo para produção de antibacterianos por *Trichoderma* sp. Este autor concluiu que a composição do meio pode levar a uma resposta diferenciada dos fungos frente às cepas utilizadas.

Ramos e Said (2011) avaliaram o efeito das condições de cultivo na produção de metabólitos secundários bioativos pelo fungo endofítico *Arthrinium* sp. Este fungo apresentou resultados variados de acordo com o patógeno testado. O tempo de cultivo influenciou na atividade antibacteriana, principalmente em relação à *S. aureus*, pois *Arthrinium* sp. só foi capaz de inibir esse patógeno após 18 dias de cultivo. A fonte de carbono, a proporção carbono/nitrogênio, o pH e a temperatura também foram fatores que influenciaram na produção dos antibacterianos deste fungo.

Testando diferentes condições de cultivo, Manhães (2015) analisou o fungo endofítico *Cochliobolus sativus* em diferentes meios (BD, meio mínimo e Czapek-dox), fotoperíodo (com e sem) e tempo de incubação (10 e 20 dias), totalizando 12 extratos, que posteriormente foram extraídos com acetato de etila. Ao testar estes extratos contra bactérias patogênicas, obteve resultados distintos para extrato, concluindo, dessa forma, que houve relação entre a condição de cultivo do fungo e produção de compostos antimicrobianos.

Anwar e Iqbal (2017) otimizaram as condições de cultivo de *T. harzianum* para a produção de antibacterianos eficazes contra fitopatógenos. Extratos obtidos de diferentes meios, pHs, temperaturas, agitação e luminosidade foram testados contra *Xanthomonas campestris* e *Clavibacter michiganensis* e, destes, apenas os resultados obtidos com diferentes luminosidades não apresentaram diferença significativa. As condições que proporcionaram a obtenção de halos mais potentes foi o meio caldo nutriente, pH 5,0, à 25 °C e com agitação.

Com base nesses relatos, observa-se que, independentemente da espécie fúngica ou do tipo de condição de cultivo estudada, as condições de cultivo podem influenciar na capacidade do fungo sintetizar os antibacterianos. Porém, pesquisas utilizando um único fungo cultivado sob diferentes condições de cultivo não só podem servir para produzir diferentes compostos, mas também podem fornecer condições para guiar a produção de um composto específico e facilitar o processo de purificação do composto desejado (RAMOS; SAID, 2011).

3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os seis filtrados mais promissores no teste antibacteriano em microplacas tiveram suas concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas determinadas pelo teste de microdiluição. O menor valor de CIM e CBM foram obtidos a partir do cultivo de *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0, obtendo CIM de 0,16 mg/mL e CBM de 0,31 mg/mL, ambas contra o patógeno CBAM 0319 (Tabela 11, Apêndice A).

Apesar do efeito antibacteriano dos filtrados de *Trichoderma*, os valores de CIM ficaram abaixo dos relatados na literatura. Esse resultado provavelmente está relacionado ao fato dos filtrados terem sido utilizados na sua forma bruta, que é o sobrenadante do cultivo fúngico, sem qualquer tipo de separação ou extração de seus compostos.

Ishii *et al.* (2013) isolaram um antibacteriano produzido por *Trichoderma* sp. e o identificaram como citosporona. Os valores de CIM deste composto variaram de 12,5 µg/mL a >100 µg/mL dependendo do patógeno testado. Para *S. aureus* a CIM obtida pela citosporona foi de 50 µg/mL. A possível explicação para valores de CIM tão abaixo da nossa pesquisa é que, ao trabalhar com o filtrado bruto, a concentração do composto bacteriano poderia estar baixa, pois os antibacterianos estão junto com todos os produtos do metabolismo fúngico.

Narendran e Kathiresan (2016) relataram a atividade antimicrobiana de *Trichoderma* sp. isolado da rizosfera de *R. annamalayana*, em um manguezal de Pichavaram (Índia). O extrato foi obtido do cultivo deste fungo em BD por 28 dias e realizada a extração com acetato de etila. Este extrato obteve CIM de 150 µg/mL para *S. aureus*.

Ao utilizarem o solvente acetato de etila, Leylaie e Zafari (2017) obtiveram menores valores de CIM e CBM para *T. brevicompactum*, *T. longibrachiatum* e *T. asperellum* contra *S. aureus* em comparação ao solvente metanol. O menor valor de CIM para esses fungos foi de 7,8 µg/mL e o menor valor de CBM foi de 15,6 µg/mL. Com isso, nota-se que o solvente escolhido para a extração dos compostos antibacterianos pode influenciar diretamente nos resultados, isso acontece devido à diferença de polaridade entre os solventes, assim extraem moléculas diferentes a partir do extrato bruto.

Além disso, outro fator importante é a escolha das condições de cultivo dos fungos. Guedes (2011) obteve extratos com acetato de etila a partir do caldo de cultivo em BD de *T. stromaticum*, obtendo CIM de 15,63 µg/mL contra *S. aureus*. Quando esta linhagem de *Trichoderma* foi cultivada em meio líquido malte 2%, a CIM obtida para *S. aureus* foi de 62,50 µg/mL; o valor da CIM também foi superior para os outros patógenos testados quando o fungo foi cultivado em malte 2%.

Resultados semelhantes foram encontrados em nossa pesquisa ao obter a CIM de filtrados de *Trichoderma* spp. cultivado em diferentes condições. O fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0235 foi cultivado em meio Farelo de trigo, pH 5,0 e em duas condições de luminosidade (ausência de luz e muita luz), a qual influenciou nos valores de CIM contra *S. aureus*. O filtrado obtido do cultivo do fungo exposto a muita luz obteve menores valores de CIM para seis dos dez patógenos e menores valores de CBM para sete patógenos em comparação ao filtrado obtido a partir do cultivo em ausência de luz (Tabela 11).

O fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0767 foi cultivado em BD, pH 5,0 e duas condições de luminosidade (ausência de luz e muita luz). Este fungo também apresentou valores de CIM e CBM menores quando cultivado na condição muita luz: os valores de CIM foram menores para nove patógenos e os de CBM foram menores para sete patógenos. Assim, nota-se que para estes dois fungos a condição de luminosidade influencia diretamente na quantidade de filtrado que será necessário para inibir ou matar o patógeno.

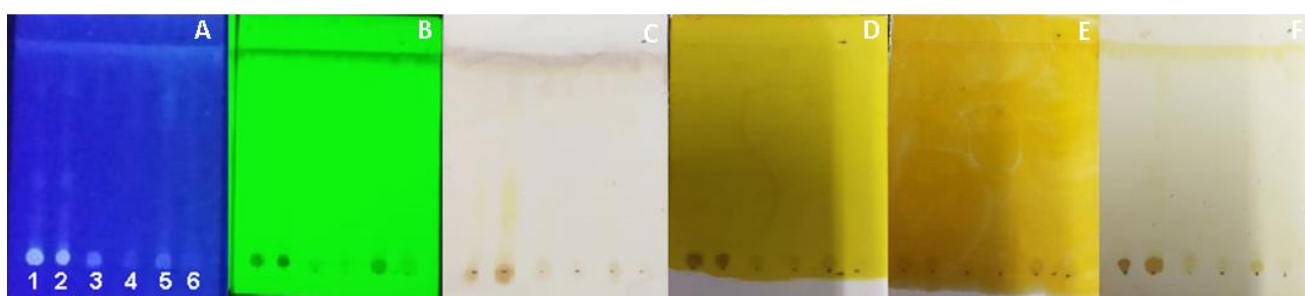
Tabela 11 - Resultado do teste de microdiluição para identificação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos filtrados de *Trichoderma* spp. contra *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	Fungo/Filtrado											
	<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235		<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235		<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235		<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767		<i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767		<i>T. harzianum</i> CFAM 1155	
	Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0		Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0		Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0		BD, ausência de luz, pH 5,0		BD, muita luz, pH 5,0		BD, ausência de luz, pH 5,0	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
CBAM 0274	1,87	7,5	0,94	7,5	1,87	3,75	0,62	5,0	0,31	2,5	0,94	1,87
CBAM 0318	1,87	1,87	0,94	0,94	0,94	7,5	0,62	2,5	0,31	1,25	1,87	3,75
CBAM 0319	1,87	3,75	0,94	0,94	0,94	3,75	0,31	2,5	0,16	0,31	1,87	1,87
CBAM 0320	1,87	3,75	1,87	3,75	1,87	>7,5	1,25	5,0	0,31	1,25	0,94	1,87
CBAM 0321	3,75	>7,5	1,87	1,87	1,87	3,75	0,62	5,0	0,31	2,5	0,94	1,87
CBAM 0323	1,87	7,5	3,75	>7,5	0,94	>7,5	0,62	2,5	0,62	1,25	0,94	0,94
CBAM 0325	3,75	>7,5	1,87	7,5	1,87	>7,5	1,25	5,0	0,62	>5,0	0,94	3,75
CBAM 0326	3,75	>7,5	1,87	7,5	1,87	>7,5	1,25	5,0	0,62	5,0	1,87	3,75
CBAM 0327	3,75	7,5	3,75	3,75	0,94	1,87	0,62	1,25	0,31	0,62	0,23	0,94
ATCC 80958	3,75	>7,5	3,75	7,5	1,87	7,5	1,25	5,0	0,62	5,0	0,47	7,5

3.4 Cromatografia em camada delgada (CCD) e Bioautografia

Os perfis cromatográficos dos filtrados utilizados no teste de CIM e CBM foram analisados por cromatografia em camada delgada e comparados quando obtidos do mesmo fungo (FIGURA 5).

Figura 5 - Perfis cromatográficos de filtrados obtidos de *Trichoderma* spp., onde: 1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0, 2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0, 3: *Trichoderma harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0, 4: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0, 5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0, 6: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0. Reveladores: A: UV 365 nm, B: UV 254 nm, C: anisaldeído, D: cloreto férrico, E: Dragendorff, F: iodo



Para o sistema de eluição utilizado nas cromatofolhas somente foi possível observar a separação de substâncias em luz ultravioleta (UV) a 365 nm. Nos demais reveladores foi possível observar a revelação apenas na origem da aplicação das amostras 1 e 2, com exceção do reagente de Dragendorff. Por se tratarem de amostras aquosas, possivelmente as substâncias presentes possuem polaridade alta, principalmente açúcares e outros metabólitos que possuam grupos hidroxila em suas estruturas, o qual forma pontes de hidrogênio com a sílica presente na cromatoplaça, dificultando a separação destes durante o processo de eluição.

Para o revelador cloreto férrico houve a formação de coloração escura na origem de aplicação das amostras 1 e 2, que aponta indícios da presença de substâncias fenólicas. Nas mesmas amostras o iodo revelou manchas marrons, o que é característico de compostos com ligações duplas. O revelador anisaldeído revelou fracamente na amostra 2, o que pode indicar a presença de terpenos.

Após a eluição dos filtrados nas cromatoplaças e revelação das mesmas, foi realizado o cálculo do valor dos R_f 's das bandas visualizadas sob UV a 365 nm. A cromatoplaça foi submetida ao procedimento de bioautografia e o resultado da atividade antibacteriana encontra-se na Tabela 12.

As amostras obtidas do cultivo do mesmo fungo puderam ser comparadas após visualização de suas bandas em UV a 365 nm e determinação de seus R_f 's. As amostras 1 e 2

foram obtidas do cultivo de *Trichoderma* sp. CFAM 0767, cultivado em mesmo meio e pH, diferindo apenas quanto à luminosidade. Apesar de terem sido obtidos valores de CIM e CBM diferentes para as duas amostras, elas apresentaram perfil cromatográfico bem semelhante, o que pode indicar que se trata dos mesmos compostos. Porém, após bioautografia apenas uma banda da amostra 1 apresentou halo para o patógeno *S. aureus* ATCC 80958.

Tabela 12 - Valores dos Fatores de retenção (*R_f*s) presentes nas amostras eluídas nas cromatoplacas e determinação de sua ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 80958 através de bioautografia

Filtrado	Valores de <i>R_f</i> $\lambda = 365 \text{ nm}$	Ação antibacteriana
1. <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0	0,15	Ausente
	0,37	Presente
	0,5	Ausente
	0,7	Ausente
	0,8	Ausente
2. <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0	0,15	Ausente
	0,37	Ausente
	0,5	Ausente
	0,7	Ausente
	0,8	Ausente
3. <i>Trichoderma harzianum</i> CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0	0,17	Ausente
	0,5	Ausente
	0,75	Presente
	0,82	Presente
	0,92	Presente
4. <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0	0,57	Ausente
	0,67	Ausente
5. <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0	0,57	Ausente
	0,67	Ausente
6. <i>Trichoderma</i> sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0	0,57	Ausente
	0,67	Ausente

A amostra 3, obtida do cultivo de *T. harzianum* CFAM 1155, apresentou cinco bandas na cromatoplaça, e destas, três apresentaram halos de inibição contra o patógeno

testado, o que pode sugerir que este fungo produz três compostos distintos com ação antibacteriana.

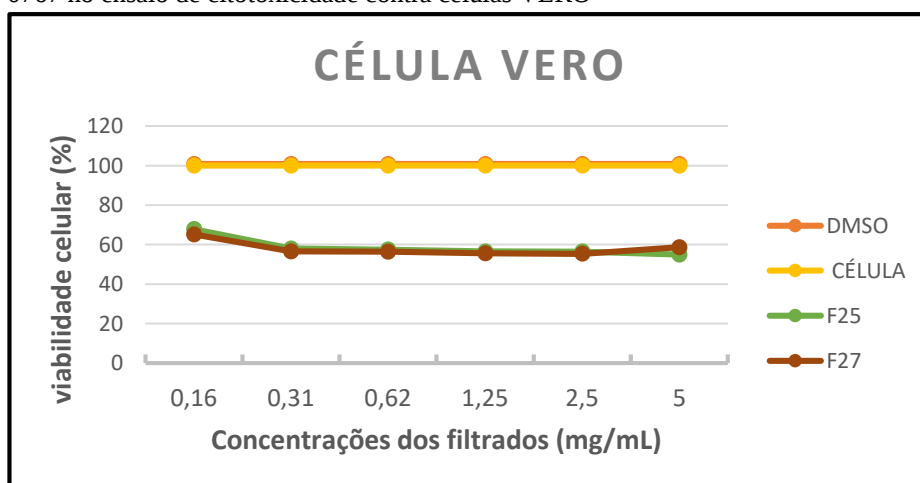
As amostras 4, 5 e 6 foram obtidas a partir do cultivo de *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em diferentes condições e apresentaram perfil cromatográfico e resultado de bioautografia iguais, o que sugere se tratar dos mesmos compostos. Além disso, devido à ausência de formação de halo de inibição, pode-se inferir que há sinergismo entre os compostos produzidos pelo fungo e assim, ao separá-los durante a cromatografia, houve a perda da ação antibacteriana da amostra (Tabela 12).

3.5 Teste de citotoxicidade

Os resultados de viabilidade celular obtidos para diferentes concentrações de extrato foram colocados em gráfico para obtenção dos índices de citotoxicidade (IC_{50}). De acordo os resultados obtidos, as amostras utilizadas apresentaram viabilidade celular que variaram de 54 a 67% nas concentrações testadas (FIGURAS 6 e 7).

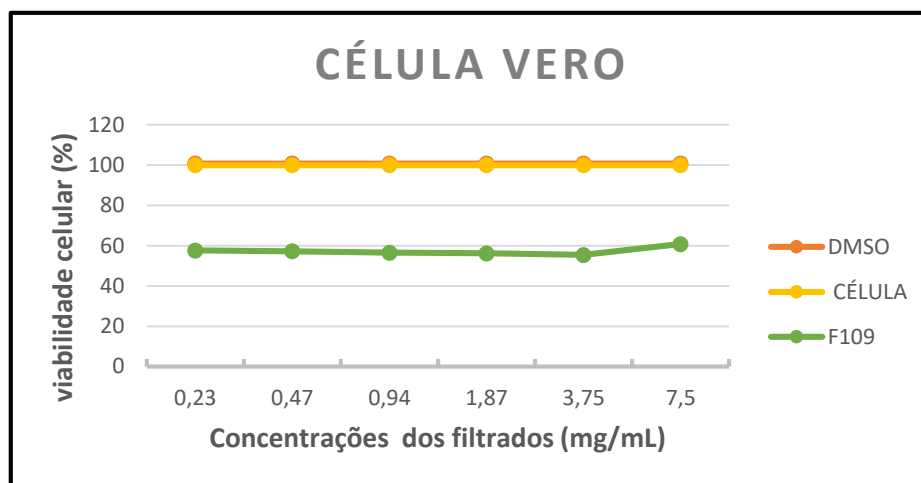
A amostra é considerada não tóxica quando sua curva de viabilidade celular fica acima da linha correspondente a 50% para todas as concentrações. Quando a curva de viabilidade celular cruza a linha de 50%, o índice de citotoxicidade (IC_{50}) da amostra é obtido do eixo da concentração do extrato, no ponto do cruzamento.

Figura 6 – Curvas de viabilidade celular dos filtrados obtidos de *Trichoderma* sp. CFAM 0767 no ensaio de citotoxicidade contra células VERO



F25: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;
 F27: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Figura 7 - Curvas de viabilidade celular do filtrado obtido de *Trichoderma harzianum* CFAM 1155 no ensaio de citotoxicidade contra células VERO



F109: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0.

Na figura 6 estão apresentadas as curvas de viabilidade celular dos filtrados obtidos do fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0767. Nesta figura pode ser observado que nenhuma das concentrações testadas conseguiu matar 50% das células, logo não foi possível identificar o valor de IC₅₀ entre estas concentrações. Assim, nas concentrações testadas estes filtrados não são considerados tóxicos para células VERO. Além disso, houve pouca diferença entre as curvas de viabilidade celular dos dois filtrados.

Na figura 7 é possível observar a curva de viabilidade celular do filtrado obtido do cultivo de *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0. Nenhuma das concentrações testadas foi considerada tóxica para as células VERO, não sendo possível identificar o valor de IC₅₀ entre as concentrações trabalhadas.

4 CONCLUSÕES

As espécies *T. lixii*, *T. reesei*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. harzianum* e *T. virens*, além de algumas culturas identificadas como *Trichoderma* sp., produziram compostos eficazes na inibição de *S. aureus*.

As condições de cultivo escolhidas para o crescimento desses fungos influenciaram na produção de antibacterianos.

Entre as culturas utilizadas para avaliação da influência das condições de cultivo na produção de antibacterianos, o fungo *Trichoderma* sp. CFAM 0767 mostrou-se o fungo mais promissor, obtendo os menos valores de concentração inibitória e bactericida mínima.

É necessário que se aprofunde o conhecimento sobre as características dos compostos produzidos por este fungo, além de identificar a que espécie ele pertence.

Os três filtrados mais promissores não apresentaram citotoxicidade contra células VERO nas concentrações necessárias para inibir ou matar *S. aureus*.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE BANANA (<i>Musa spp.</i>) CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i>
--

RESUMO

A resistência antimicrobiana é uma das maiores ameaças para os seres humanos e que reduz drasticamente as chances de cura de doenças infecciosas, aumentando a morbidade e mortalidade associadas a doenças bacterianas comuns. Devido a isso, surge a necessidade de pesquisas contínuas para que sejam obtidos novos antibióticos capazes de combater os microrganismos resistentes. Um recurso natural que pode ser utilizado para isto é a banana, fruta fresca mais consumida no mundo e que gera milhões de toneladas de resíduos no meio ambiente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de variedades de bananeira (*Musa* spp.) contra *Staphylococcus aureus*. Este trabalho surgiu como consequência do trabalho desenvolvido com os fungos do gênero *Trichoderma*, pois durante a elaboração de um meio de cultura para o crescimento fúngico tendo como substrato cascas de banana, observou-se que esta possui propriedades antibacterianas contra os patógenos testados. Assim, inicialmente foram obtidos extratos aquosos de cascas e polpas de três variedades de bananeira (Pacovan, Maçã e Prata), verdes e maduras, sendo então esterilizados em autoclave e solidificados para a sua utilização no teste antibacteriano pelo método do bloco de gelose. Com base nesses resultados selecionou-se a variedade mais promissora e foram testadas diferentes formas de extração dos antibacterianos, esses extratos então foram avaliados contra os patógenos em microplacas de 96 poços. Os extratos mais promissores foram submetidos a teste de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). No método do bloco de gelose, todos os extratos obtidos a partir das cascas verdes e maduras inibiram pelo menos duas das nove cepas de *S. aureus* testadas. Os extratos de casca que inibiram o maior número de cepas patogênicas foram obtidos da banana Prata, inibindo cinco cepas de *S. aureus*, tanto aqueles obtidos da casca verde quanto da casca madura. Em relação aos extratos obtidos das polpas, apenas os obtidos da banana Maçã verde e da banana Prata verde inibiram os patógenos, inibindo três e quatro cepas, respectivamente. Por esse motivo, foram testadas diversas formas de extração dos antibacterianos presentes na casca da banana Prata. Ao realizar-se o teste antibacteriano com estes extratos, verificou-se que os extratos obtidos nas formas batida/autoclave/10 minutos, fresca/Millipore/10 minutos e fresca/Millipore/20 minutos obtiveram os melhores resultados quando testados em microplacas de 96 poços. Porém, o extrato obtido na forma Fresca/Millipore/20 minutos obteve os menores valores de CIM e CBM para todas as cepas de *S. aureus*, mostrando-se como a forma mais eficaz de extração. Com base nesses resultados, conclui-se que as bananas das variedades Pacovan, Maçã e Prata possuem compostos antibacterianos eficazes contra *S. aureus*, sendo a banana Prata a melhor opção na obtenção desses compostos. Estes apresentam a vantagem de não serem termosensíveis e também de serem facilmente extraídos com água quente.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Casca de banana. Resíduo alimentar.

1 INTRODUÇÃO

As fontes alimentares mais importantes do mundo são ocupadas pelo arroz, trigo, milho e banana (PERREIER *et al.*, 2011), sendo esta última a fruta fresca mais consumida no mundo. O Brasil é o quarto produtor e o primeiro consumidor mundial de bananas, produzindo 7,1 milhões de toneladas praticamente para consumo interno (LIMA; SILVA; FERREIRA, 2012). Considerando que 30-40% de seu peso corresponde à casca, tem-se uma geração de até 2,84 milhões de toneladas de resíduos de casca de banana por ano (FRANCO; CASTRO; WALTER, 2015).

Além do seu consumo *in natura*, a banana pode dar origem a diversos produtos. A banana verde pode ser utilizada para obtenção de produtos de panificação, na produção de farinha, amido e *chips*. Da banana madura podem ser produzidas bananas em calda, desidratada, *catchup*, *chips*, congelados, doces em massa, essências, farinha, flocos, granulados, geleias, néctares, purês, sucos, vinagres e vinhos (GODOY *et al.*, 2012).

Os resíduos de cascas de frutas são obtidos em grande quantidade como subproduto de indústrias de processamento de alimentos e suco, hotéis e restaurantes. Esses resíduos podem causar sérios problemas ambientais, a menos que sejam descartados adequadamente ou convertidos em um produto útil (TIBOLLA; PELISSARI; MENEGALLI, 2014).

Existem alguns trabalhos publicados sobre o reaproveitamento destas cascas, que incluem a produção de etanol (DANMALIKI *et al.*, 2016), metano (KHAN *et al.*, 2016), alimentação animal (ABEL *et al.*, 2015; PIMENTEL *et al.*, 2017) e uso como adsorventes para purificação de água (AL-QAHTANI, 2016). Além disso, compostos com diferentes atividades, como antimicrobiana, antioxidante, anti-proliferativa, anti-inflamatória, já foram isolados de diferentes cascas (PARASHAR; SHARMA; GARG, 2014).

Apesar de serem valiosos, os produtos naturais têm uma parcela de desafios. Uma das principais questões são as dificuldades para obtenção de quantidades suficientes de material para os trabalhos de descoberta e desenvolvimento de um produto. Se o composto é derivado de uma planta que cresce em pequenas quantidades ou cresce em locais remotos, a continuidade da pesquisa pode ser prejudicada (KRAUSE; TOBIN, 2013). Nesta pesquisa, objetivou-se trabalhar com resíduos visando evitar este tipo de problema. Além disso, a banana é uma fruta bastante consumida no Amazonas, portanto descarta-se grande quantidade de cascas, tanto verdes, quanto maduras. Desta forma, o uso de cascas de banana como fonte de novos antibióticos é uma alternativa econômica, fácil de executar e que pode ajudar o meio ambiente.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção das amostras

As bananas utilizadas neste trabalho foram obtidas em bancas de vendas na Feira da Banana, localizada em Manaus-AM, sendo do tipo Prata, Maçã e Pacovan.

Para o teste de triagem, foi realizada a obtenção da infusão das cascas e das polpas, verdes e maduras. As cascas foram lavadas e pesadas, sendo utilizado 200 g para cada 1000 mL de água. Em seguida, foram cortadas em pequenos pedaços e fervidas por dez minutos em água destilada. Após esse processo, foram separadas do caldo com auxílio de peneira e coador. A este caldo foram adicionados 15 g de ágar a cada 1000 mL, sendo autoclavado por 20 minutos a 121 °C. O mesmo processo foi repetido para a obtenção dos extratos das polpas. Optou-se pela utilização do extrato adicionado de ágar para que fosse possível a realização de *screening* pelo método do bloco de gelose. Os extratos foram armazenados em geladeira até a realização do teste antibacteriano contra as cepas de *Staphylococcus aureus*.

2.2 Screening para detecção de atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos de banana foi avaliada qualitativamente em meio sólido pelo “Método do Bloco de Gelose” (ICHIKAWA; ISHIKURA; OZAKI, 1971), contra nove cepas de *S. aureus* (Tabela 1) cedidas pela Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM, pertencente à Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz-Amazônia.

Tabela 1 - Culturas clínicas de *Staphylococcus aureus* utilizadas para realização dos testes antibacterianos

Espécie	Nº de registro da cultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	CBAM 0274
	CBAM 0318
	CBAM 0319
	CBAM 0320
	CBAM 0321
	CBAM 0323
	CBAM 0325
	CBAM 0326
	CBAM 0327

Após o preparo e solidificação das amostras foram retirados três fragmentos de ± 8 mm de diâmetro em forma circular (*plug*) de cada um, para que em seguida fossem depositados sobre os patógenos.

Paralelamente, os patógenos foram inoculados em placas com ágar Mueller-Hinton e incubados a 37 °C por até 24h, dos quais foram retiradas colônias isoladas para o preparo da suspensão celular em solução salina 0,85%, cuja turbidez era semelhante à coluna 0,5 da escala de McFarland (correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

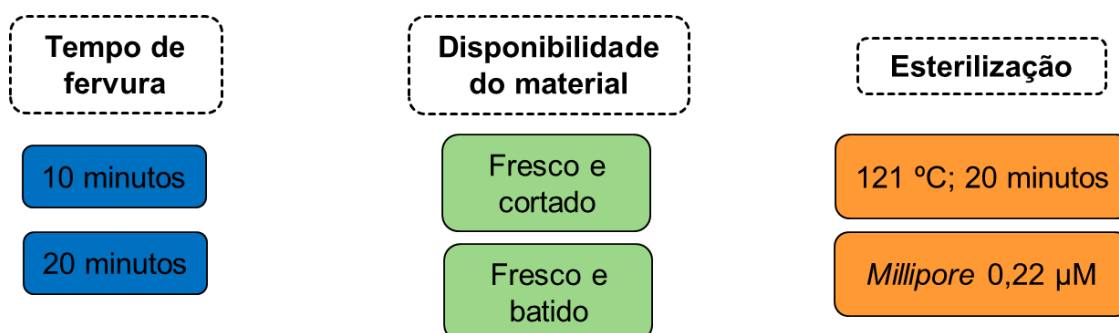
A partir da suspensão celular dos patógenos, 150 μ L foram retirados e semeados com auxílio de *swab* na superfície de meio de cultura ágar Mueller-Hinton. Em seguida, os *plugs* das infusões de banana foram depositados na superfície destas placas. O controle positivo consistiu na aplicação de discos de papel de filtro contendo cloranfenicol (5 mg/mL) no centro das placas, as quais foram incubadas a 37 °C por 24h. A avaliação consistiu na determinação da presença/ausência de halos de inibição e medição dos mesmos.

2.3 Extração de compostos antibacterianos

Com base nos resultados do teste anterior, foi selecionada a variedade mais promissora, o estágio de maturação ideal e qual parte dela (casca ou polpa) tem mais potencial na inibição de *S. aureus*. Dessa forma, foram testadas diversas formas de extração da casca da banana Prata madura visando definir qual a melhor forma de extração dos antibacterianos.

As formas de extração que foram testadas estão detalhadas na Figura 1. As variáveis trabalhadas foram tempo de fervura (10 ou 20 minutos), disponibilidade do material (fresco cortado ou fresco cortado e batido em liquidificador) e processo de esterilização (calor úmido ou membrana *Millipore* 0,22 μ M), totalizando oito formas de extração, sendo todas aquosas.

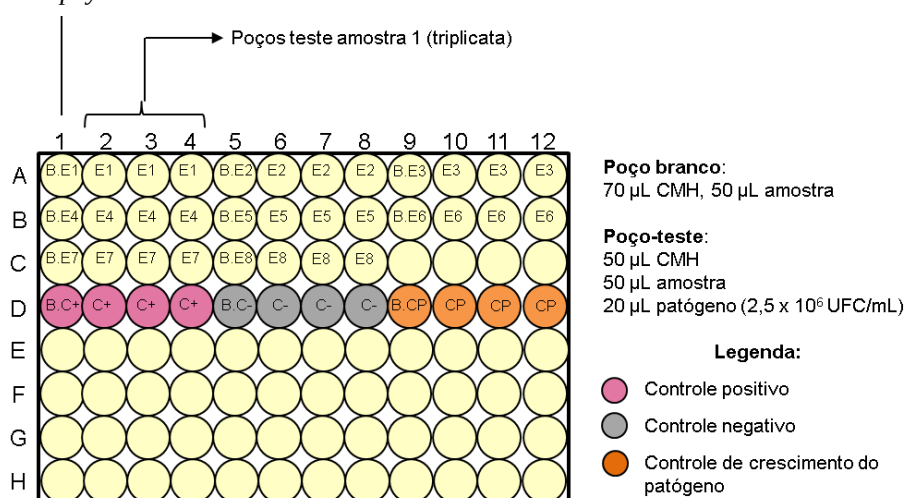
Figura 1 – Variáveis trabalhadas na extração de compostos antibacterianos da casca da banana Prata



2.4 Teste antibacteriano dos extratos em microplacas de 96 poços

Todas as amostras tiveram sua atividade antibacteriana avaliada em microplacas de 96 poços (FIGURA 2) contra as nove cepas de *S. aureus* utilizadas no teste anterior e contra a cepa *S. aureus* ATCC 80958. Para este teste utilizou-se como base a metodologia proposta pelo documento M07-A9 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012), que normatiza o teste de microdiluição.

Figura 2 - Método de inoculação em microplacas de 96 poços para determinação da atividade antibacteriana dos extratos de casca de banana Prata contra *Staphylococcus aureus*



2.4.1 Suspensão celular do patógeno

Inicialmente foram preparadas as suspensões celulares dos patógenos, cultivando-os em caldo Mueller-Hinton por ± 24 h a 37°C . Alíquotas deste cultivo foram retiradas para leitura em espectrofotômetro para medição da densidade ótica a 600 nm, realizando-se ou não diluições do inóculo com caldo Mueller-Hinton, a fim de se obter uma turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL), ou seja, com um valor de absorbância compreendido entre 0,08 – 0,1.

Após esse procedimento, foi realizada nova diluição em caldo Mueller-Hinton até que fosse alcançada a concentração $2,5 \times 10^6$ UFC/mL. Sendo assim, ao inocular-se 20 μ L da suspensão no poço-teste a concentração de patógeno foi de 5×10^4 UFC/poço, que é a concentração indicada pelo CLSI.

2.4.2 Preparo das microplacas

Este teste foi preparado visando leitura posterior do crescimento em leitor de microplacas (Bio Rad iMark™). Por isso a montagem do teste consistiu em poços contendo o branco e poços-teste contendo os filtrados (FIGURA 2).

Em todos os poços-teste foram adicionados 50 µL de caldo Mueller-Hinton, 50 µL da amostra e 20 µL da suspensão celular do patógeno ($2,5 \times 10^6$ UFC/mL), em triplicata. Nos poços contendo o branco foram adicionados 70 µL de caldo Mueller-Hinton e 50 µL da amostra. Foram realizados os controles positivo (cloranfenicol 30 µg/mL), negativo (solvente) e de crescimento do patógeno. As microplacas foram incubadas em estufa do tipo BOD a 37 °C por 24h, realizando-se a leitura do crescimento bacteriano em leitor de microplacas Bio Rad iMark™, em comprimento de onda de 595 nm.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística descritiva (desvio padrão e média) e ANOVA, com nível de significância de 5%. As médias diferentes foram analisadas por meio do Teste de Tukey, utilizando-se o programa Minitab 18.

2.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As amostras com melhores resultados tiveram sua Concentração Inibitória Mínima determinada pelo método de microdiluição seguindo as recomendações do CLSI (2012), documento M07-A9, com adaptações para realização de leitura espectrofotométrica.

2.5.1 Preparo das amostras

As amostras foram liofilizadas, pesadas e ressuspensas em água destilada esterilizada até obter-se a concentração de 10 mg/mL. Dessa forma, após a diluição seriada obteve-se sete diluições testadas (referentes a linha A até G): 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 e 0,078 mg/mL. Porém, em alguns casos foram testadas outras concentrações, maiores ou menores, dependendo dos resultados obtidos.

2.5.2 Preparo das microplacas

Em microplacas de 96 poços foram distribuídos 100 µL de caldo Mueller-Hinton em todos os poços da linha A até G. Na linha A da placa foram adicionados 100 µL das amostras

em quadruplicata (um poço referente ao branco e três poços-teste). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até alcançar a linha G.

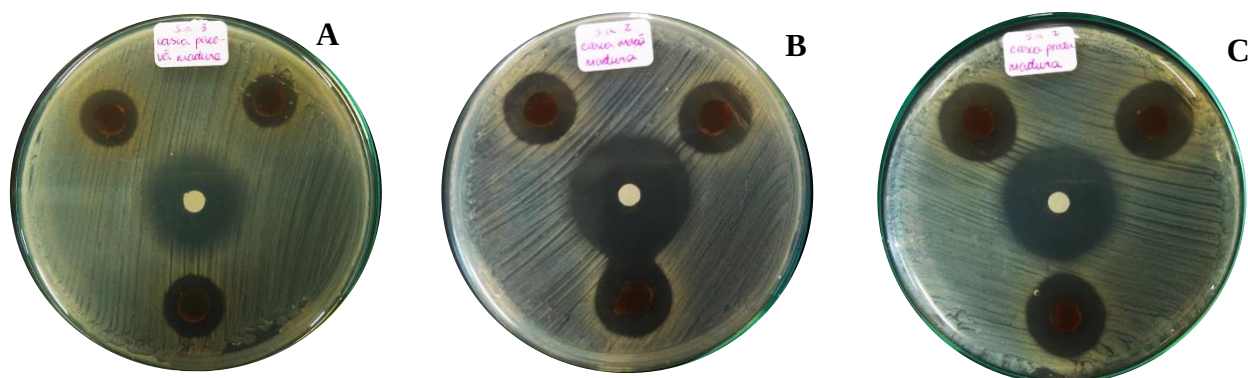
As colunas 1, 5 e 9 foram referentes ao branco de cada amostra, em cada uma das concentrações testadas. As colunas 2-4, 6-8, 10-12 eram referentes aos poços-teste, que após a diluição passaram a ter 100 µL resultantes da mistura de meio de cultura (CMH) e amostra. Nestes poços-teste foram inoculados 20 µL da suspensão celular do patógeno preparada da mesma forma citada no tópico 2.3.1. Assim, cada poço da microplaca ficou com o volume total de 120 µL.

A linha D foi utilizada como controle, sendo realizados controle positivo (cloranfenicol 30 µg/mL), controle negativo (solvente) e controle de crescimento do patógeno. Após esse processo, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24h, sendo então realizada a leitura de absorbância ótica no aparelho Bio Rad iMark™ em comprimento de onda de 595 nm. A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento visível do patógeno (valor de absorbância 0,05).

2.6 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é a menor concentração de antibacteriano que mata pelo menos 99,9% do inóculo microbiano. Este teste foi realizado com base nos resultados obtidos no teste de CIM, utilizando-se como inóculo as suspensões originárias dos poços-teste das microplacas em que foi verificado a ausência de crescimento microbiano durante a leitura espectrofotométrica. Placas de Petri com meio ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com 20 µL de inóculo dos poços citados e incubadas a 37 °C por 24h (FABRIS, 2017). A CBM foi considerada como a menor concentração das amostras em que não houve crescimento microbiano sobre o ágar Mueller-Hinton.

Figura 3 - Atividade antibacteriana de infusões de banana contra *Staphylococcus aureus*. A: casca de banana Pacovan madura x CBAM 0319; B: casca de banana Maçã madura x CBAM 0318; C: casca de banana Prata madura x CBAM 0318



Apesar de todas as variedades de bananeira estudadas terem apresentado atividade antibacteriana, os resultados variaram de acordo com a parte escolhida (casca ou polpa) e de acordo com seu estágio de maturação.

Entre as infusões obtidas de polpas, apenas as de bananas Maçã e Prata mostraram atividade antibiótica. Quando obtidos de frutos verdes, as infusões inibiram alguns dos patógenos, o que não foi visualizado com as infusões destas mesmas bananas na fase madura, que não apresentaram atividade antibacteriana.

Resultados positivos para polpas de banana também foram relatados por outros autores. Fagbemi *et al.* (2009) obtiveram extratos etanólicos e aquosos de polpas verdes de banana (*M. sapientum*) e testaram suas atividades antimicrobianas contra diferentes patógenos, entre eles *S. aureus*, obtendo halos de inibição de 31 mm e 15 mm, respectivamente. Zafar *et al.* (2011) obtiveram extratos metanólicos de polpas de *M. sapientum*, os quais foram capazes de inibir *S. aureus*, obtendo halo de inibição de 15 mm, além de inibir diversos patógenos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos.

A atividade antibiótica da polpa de *M. sapientum* também foi comprovada por Jain *et al.* (2012), que utilizaram três tipos de solventes e testaram suas atividades antibióticas contra oito espécies de bactérias patogênicas. Os extratos obtidos com hexano não inibiram nenhum dos patógenos e os extratos obtidos com acetato de etila e etanol inibiram todos os patógenos, obtendo halos de 24 e 21,5 mm, respectivamente, contra *S. aureus*.

Em relação às cascas, não foi observada diferença na atividade antibiótica em relação ao estágio de maturação da banana, pois as infusões obtidas de cascas das três variedades inibiram as mesmas cepas de *S. aureus* quando verdes e maduras (Tabela 2).

Nenhum dos trabalhos publicados até o momento realizou o estudo comparativo da atividade antibiótica das cascas de banana quando verdes e maduras. Porém, alguns trabalhos confirmam a existência de atividade antibiótica de cascas de banana, mesmo trabalhando com espécies diferentes.

Karadi *et al.* (2011) utilizaram cascas de *M. paradisiaca* secas e moídas para a realização de extração de biomoléculas com diclorometano e metanol (1:1). O extrato obtido foi eficaz contra *S. aureus*, obtendo halos de inibição que variaram de 11 a 18 mm, dependendo da concentração testada. Zafar *et al.* (2011) relataram ótimos resultados com extratos metanólicos da casca de *M. sapientum*, conseguindo a inibição de todos os patógenos bacterianos e fúngico testados. Ao ser testado contra *S. aureus*, este extrato obteve halo de inibição de 8 mm.

Ighodaro (2012) obteve extratos aquosos do pó de cascas de bananas maduras (*M. paradisiaca*) e testou as suas atividades antimicrobianas em várias concentrações pelo método de ágar difusão. Estes extratos foram eficientes contra *S. aureus* a partir de 6,25 mg/mL, obtendo-se halos de inibição de 0,4 mm. O mesmo autor obteve extratos etanólicos de cascas de bananas verdes (*M. paradisiaca*), os quais inibiram *S. aureus* a partir da mesma concentração que o extrato aquoso, porém com halo de inibição de 2,7 mm.

Chabuck *et al.* (2013) obtiveram extratos aquosos de modo semelhante a nossa pesquisa, com a decocção da casca da banana utilizando água destilada. Seus extratos foram testados contra bactérias patogênicas e *Candida albicans* e apresentaram efeito de inibição contra bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus*, com zona inibitória de 30 mm.

Recentemente, Saleem e Saeed (2019) relataram a atividade antibiótica de cascas de bananas contra *S. aureus*. Estes autores utilizaram os solventes metanol, acetato de etila, etanol e água destilada para a extração dos antibacterianos. Entretanto, o extrato metanólico não foi capaz de inibir *S. aureus*. O restante dos extratos apresentaram halos de inibição de 12, 10 e 13 mm, respectivamente, pelo método de ágar difusão.

No geral, nota-se que tanto a polpa quanto a casca de banana possuem compostos antimicrobianos eficazes contra patógenos humanos. Porém, nesta pesquisa as infusões obtidas das cascas inibiram maior número de patógenos em comparação com as polpas. Em relação à variedade, a Prata inibiu maior número de patógenos com o tipo de extração utilizada. Assim, essa variedade foi selecionada para a continuidade dos testes e obtenção das infusões utilizando diferentes formas de extração.

3.2 Avaliação da atividade antibacteriana de cascas de banana prata madura

A casca da banana é composta por substâncias químicas com múltiplos aspectos biológicos e farmacológicos, o que reafirma a sua importância medicinal (BAHADAR *et al.*, 2014).

Foram realizadas oito formas de extração dos antibacterianos presentes na casca da banana Prata madura, visando definir o melhor tempo de fervura, disponibilidade da casca e forma de esterilização.

Os resultados obtidos no teste antibacteriano em microplacas de 96 poços confirmaram a ação antibacteriana dos compostos presentes na casca da banana Prata madura. Porém, ao compararmos o resultado obtido no teste do bloco de gelose, a infusão fresca, autoclave, 10 min (mesma metodologia de extração utilizada no *Screening*) inibiu maior número de patógenos quando testado nas microplacas. No primeiro caso foram inibidas as bactérias CFAM 0318, 0319, 0320, 0321 e 0323 (Tabela 2) e no segundo caso o extrato inibiu todas as bactérias, com exceção da CBAM 0327 (Tabela 3).

Isso pode ter ocorrido devido a uma possível diferença na composição das infusões, tendo em vista que não foram obtidas na mesma época ou da mesma planta. Outra possível explicação se deve ao fato de que nas microplacas o composto antibacteriano está em contato direto com o patógeno, não necessitando difundir pelo meio de cultura como no teste do bloco de gelose. Essa teoria foi reconhecida por Bona *et al.* (2014), que alegaram que compostos menos polares se difundem mais lentamente no meio de cultura, o que poderia ocasionar uma ausência de zona de inibição.

Todas as formas de extração testadas foram eficientes na extração dos compostos antibacterianos e todas as amostras inibiram todos os patógenos, com exceção da CBAM 0327, que não teve seu crescimento inibido pelos extratos Fresca, autoclave, 10 min e Batida, autoclave, 20 min (Tabela 3).

Mas apesar de todas as amostras de infusão terem ação antibiótica, algumas delas se destacaram, como a Fresca, *Millipore*, 10 min, que foi classificada como a melhor estatisticamente para todos os patógenos. As infusões Fresca, *Millipore*, 20 min e Batida, autoclave, 10 min também mostraram resultados satisfatórios, estando estatisticamente entre as melhores para nove patógenos. Dessa forma, as três amostras foram selecionadas para a determinação das suas concentrações inibitória e bactericida mínima.

Tabela 3 - Valores de absorbância obtidos após leitura de crescimento de *Staphylococcus aureus* em leitor de microplacas (595 nm) após ensaio de atividade antibacteriana de infusões obtidas da casca da banana Prata madura

Forma de extração	CBAM 0274	CBAM 0318	CBAM 0319	CBAM 0320	CBAM 0321	CBAM 0323	CBAM 0325	CBAM 0326	CBAM 0327	ATCC 80958
Fresca, autoclave, 10 min	0,037 ^B	0,028 ^{B,C}	0,048 ^{B,C}	0,006 ^D	0,025 ^B	0,006 ^B	0,14 ^B	0,0 ^B	0,12 ^A	0,0 ^B
Fresca, autoclave, 20 min	0,029 ^{B,C}	0,022 ^{B,C}	0,055 ^B	0,0 ^D	0,032 ^B	0,0 ^B	0,019 ^C	0,078 ^B	0,033 ^B	0,05 ^B
Batida, autoclave, 10 min	0,002 ^D	0,0 ^C	0,0 ^D	0,018 ^{C,D}	0,025 ^B	0,008 ^B	0,002 ^C	0,008 ^B	0,05 ^B	0,004 ^B
Batida, autoclave, 20 min	0,038 ^B	0,0 ^C	0,055 ^B	0,088 ^B	0,057 ^B	0,021 ^B	0,007 ^C	0,026 ^B	0,176 ^A	0,051 ^B
Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	0,002 ^D	0,0 ^C	0,004 ^D	0,005 ^D	0,001 ^B	0,013 ^B	0,0 ^C	0,007 ^B	0,004 ^B	0,011 ^B
Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	0,007 ^{C,D}	0,0 ^C	0,0 ^D	0,002 ^D	0,01 ^B	0,013 ^B	0,003 ^C	0,007 ^B	0,005 ^B	0,012 ^B
Batida, <i>Millipore</i> , 10 min	0,044 ^B	0,04 ^B	0,049 ^{B,C}	0,042 ^C	0,032 ^B	0,016 ^B	0,051 ^C	0,072 ^B	0,05 ^B	0,0 ^B
Batida, <i>Millipore</i> , 20 min	0,028 ^{B,C,D}	0,004 ^C	0,0 ^D	0,007 ^D	0,036 ^B	0,021 ^B	0,002 ^C	0,0 ^B	0,023 ^B	0,017 ^B
Controle CMH	0,094 ^A	0,123 ^A	0,146 ^A	0,687 ^A	0,192 ^A	0,566 ^A	0,568 ^A	0,822 ^A	0,176 ^A	0,33 ^A

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As infusões de casca de banana Prata mais promissoras no teste anterior tiveram suas CIM determinadas pelo método de microdiluição. O menor valor obtido para CIM foi de 0,62 mg/mL e máximo de 5,0 mg/mL. A CBM variou de 0,62 a >5,0 mg/mL. No geral, os menores valores foram obtidos pela infusão Fresca, *Millipore*, 20 minutos (Tabela 4, Apêndice B).

Tabela 4 - Concentração Inibitória e Bactericida Mínima de infusões obtidas a partir da casca da banana Prata (*Musa spp.*) contra cepas de *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	Forma de obtenção da infusão					
	Batida, autoclave, 10 min		Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min		Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	
	CIM mg/mL	CBM mg/mL	CIM mg/mL	CBM mg/mL	CIM mg/mL	CBM mg/mL
CBAM 0274	1,25	2,5	1,25	1,25	0,62	1,25
CBAM 0318	2,5	2,5	2,5	10	2,5	2,5
CBAM 0319	1,25	2,5	0,62	1,25	0,62	0,62
CBAM 0320	1,25	1,25	0,62	1,25	0,62	0,62
CBAM 0321	2,5	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5
CBAM 0323	2,5	2,5	5,0	5,0	2,5	2,5
CBAM 0325	2,5	2,5	5,0	>5,0	2,5	2,5
CBAM 0326	2,5	2,5	5,0	5,0	2,5	2,5
CBAM 0327	0,62	0,62	0,62	1,25	0,62	0,62
ATCC 80958	1,25	2,5	5,0	5,0	2,5	2,5

Os valores de CIM para extratos de banana contra *S. aureus* relatados na literatura divergem bastante entre si. Isso pode acontecer devido a diferença de compostos encontrados entre as espécies de bananas ou mesmo entre variedades distintas. Além disso, segundo Jain *et al.* (2011) as diferenças no ambiente de crescimento também podem resultar na variação de constituintes ativos em uma cultivar.

Ehiowemwenguan *et al.* (2014) obtiveram extratos aquosos e etanólicos a partir de cascas de banana, porém o extrato aquoso não apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Assim, utilizaram a técnica de diluição em tubo para determinar a CIM e CBM dos extratos etanólicos contra este patógeno, obtendo CIM de 512 mg/mL e CBM >1025 mg/mL.

Também trabalhando com extratos etanólicos da casca da banana (*M. acuminata*), Zawawy (2015) obteve CIM de 30 mg/mL contra *S. aureus*. Apesar desse valor estar bem

abaixo do obtido por Ehiowemwenguan *et al.* (2014), ainda encontra-se bem acima dos obtidos nesta pesquisa (Tabela 4).

Asoso, Akharaiyi e Animba (2016) obtiveram extratos do pó da casca da banana (*M. paradisiaca*) com metanol, etanol e acetona e testaram sua atividade antibacteriana, porém os dois primeiros solventes obtiveram melhores resultados em teste de difusão (22 e 17 mm, respectivamente). Apesar da diferença no tamanho do halo, ambos os extratos obtiveram CIM de 200 mg/mL para *S. aureus*.

Saleem e Saeed (2019) determinaram a CIM para *S. aureus* de extratos de casca de banana obtidos com os solventes acetato de etila e água destilada, obtendo 790 e 650 µg/mL, respectivamente. Portanto, para este patógeno o extrato aquoso foi mais eficaz.

Com base nesses relatos, pode-se notar que a casca da banana Prata apresenta maior potencial antibacteriano do que as bananas utilizadas em trabalhos anteriores, tendo em vista que é necessário uma quantidade muito menor de amostra para que este iniba ou mate o patógeno bacteriano.

4 CONCLUSÕES

As bananas da variedade Pacovan, Maçã e Prata possuem compostos antibacterianos eficazes contra *S. aureus* em suas cascas verdes e maduras, os quais podem ser extraídos com água quente.

As polpas das bananas Maçã e Prata também possuem antibacterianos, porém apenas quando a extração é realizada com a fruta verde.

A banana Prata foi a variedade mais promissora e a melhor forma de extração dos seus compostos foi Fresca, *Millipore*, 20 minutos.

A chance destes extratos apresentarem contraindicações ou toxicidade é muito baixa, tendo em vista que a casca da banana já é utilizada para produção de produtos alimentícios.

4 CONCLUSÃO GERAL

Os fungos do gênero *Trichoderma* sp. produzem antibacterianos eficientes contra *Staphylococcus aureus* quando cultivados em meio sólido ou meio líquido e as condições de cultivo escolhidas são importantes para que esses fungos sejam capazes de produzir esses compostos.

As variedades de banana Pacovan, Maçã e Prata são ótimas fontes para a obtenção de compostos anti-*Staphylococcus*, sendo mais indicado para a extração desses compostos em comparação aos fungos, pois no caso das bananas a extração é simples, rápida e barata, além de poder agregar valor a um resíduo alimentício facilmente encontrado.

REFERÊNCIAS

- ABEL, F. A. S.; ADEYEMI, O. A.; OLUWOLE, O. B.; OLADUNMOYE, O. O.; AYO-AJASA, O. Y.; ANUOLUWATELEMI, J. O. Effects of treated banana peel meal on the feed efficiency, digestibility and cost effectiveness of broiler chickens diet. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2015.
- ABIODUN-SOLANKE, A. O.; FALADE, K. O. A review of the uses and methods of processing banana and plantain (*Musa* spp.) into storable food products. **Journal of Agricultural Research and Development**, v. 9, n. 2, p. 85-96, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA [ANVISA]. **Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017**, Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 5979– 5987, dez. 2009.
- AHMED, S. A., GOGAL-JÚNIOR, R. M., WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224. 1994.
- ALMEIDA, C. O. In: LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2012, p. 211-214.
- AL-QAHTANI, K. M. Water purification using different waste fruit cortexes for the removal of heavy metals. **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 5, p. 700-708, 2016.
- ANWAR, J.; IQBAL, Z. Effect of growth conditions on antibacterial activity of *Trichoderma harzianum* against selected pathogenic bacteria. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 33, n. 4, p. 501-510, dez. 2017.
- ASOSO, O. S.; AKHARAIYI, F. C.; ANIMBA, L. S. Antibacterial activities of plantain (*Musa paradisiaca*) peel and fruit. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 5, p. 5-11, 2016.
- BAHADAR, N.; RAFIQ, M. K.; ISHAR, M.; KHAN, M.; CHULAM, A. Antibacterial potentials of banana peel in ethanolic and water extracts. **Journal of Biosciences and Informatics**, v. 3, n. 1, p. 492-497, 2014.
- BITRUS, A. A.; PETER, O. M.; ABBAS, M. A.; GONI, M. D. *Staphylococcus aureus*: a review of antimicrobial resistance mechanisms. **Veterinary Sciences: Research and Reviews**, v. 4, n. 2, p. 43-54, 2018.
- BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BRITO, J. P. C.; RAMADA, M. H. S.; MAGALHAES, M. T. Q.; SILVA, L. P.; ULHOA, C. J. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. **SpringerPlus**, v. 3, n. 600, p. 1-1, 2014.

CHABUCK, Z. A. G.; AL-CHARRAKH, A. H.; HINDI, N. K. K.; HINDI, S. K. K. Antimicrobial effect of aqueous banana peel extract, Iraq. **Research Gate: Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 73-75, 2013.

CHENG, G.; DAI, M.; AHMED, S.; HAO, H.; WANG, X.; YUAN, Z. Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 470, p. 1-27, 2016.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - ninth edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CRAFT, K. M.; NGUYEN, J. M.; BERG, L. J.; TOWNSEND, S. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **Medicinal Chemistry Communication**, 2019.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Natural products in drug discovery: Recent advances. In: **Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives**. 4 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.

CRAGG, G. M.; KATZ, F.; NEWMAN, D. J. The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research. **Natural Products Reports**, v. 29, n. 12, p. 1407-1423, 2012.

DANMALIKI, G. I.; MUHAMMAD, A. M.; SHAMSUDDEEN, A. A.; USMAN, B. J. Bioethanol production from banana peels. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 10, n. 6, p. 56-62, 2016.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DEBABANDYA, M.; SABYASACHI, M.; NAMRATA, S. Banana and its by-product utilisation: an overview. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 69, p. 323-329, 2010.

DRUZHININA, I. S.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; KREDICS, L.; HATVANI, L.; ANTAL, Z.; BELAYNEH, T.; KUBICEK, C. P. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. **Microbiology**, v. 154, p. 3447-3459, 2008.

EHIOWEMWENGUAN, G.; EMOGHENE, A. O.; INETIANBOR, J. E. Antibacterial and phytochemical analysis of banana fruit peel. **IOSR Journal of pharmacy**, v. 4, n. 8, p. 18-25, ago. 2014.

FABRIS, Rita de Cassia. **Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de extratos hidroalcoólicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* All. E *Qualea***

grandiflora Mart. Sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. 2017. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas), Universidade de São Paulo, Bauru, 2017.

FAGBEMI, J. F.; UGOJI, E.; ADENIPEKUN, T.; ADELOWOTAN, O. Evaluation of the antimicrobial properties of unripe banana (*Musa sapientum* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* S.) and turmeric (*Curcuma longa* L.) on pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1176-1182, 2009.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25-64, 2014.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430-449, 2017.

FRANCO, C. C.; CASTRO, M. M.; WALTER, M. E. Estudo das cascas de banana das variedades prata, caturra e maçã na bioextração de metais pesados gerados pelos efluentes dos laboratórios do Centro Universitário de Belo Horizonte. **E-xacta**, v. 8, n. 1, p. 99-115, 2015.

GARBIN, Vívien Patrícia. **Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius 1824).** 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GELLEN, L. F. A.; SILVA, D. P.; SOUZA, S. R.; FREITAS, A. C.; SCHEIDT, G. N.; NASCIMENTO, I. R. Potencial farmacológico de *Trichoderma harzianum* para fins farmacoterapêuticos. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 4, p. 91-96, 2014.

GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic Resistance Mechanism. **Medicina (Kraunas)**, v. 43, n. 3, p. 137-146, 2011.

GNANAMANI, A.; HARIHARAN, P.; SATYASEELA, M. P. *Staphylococcus aureus*: overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. In: ENANY, S.; ALEXANDER, L. E. C. (ed.). **Frontiers in Staphylococcus aureus**. InTech, p. 3-28, 2017.

GODOY, R. C. B.; POIANI, L. M.; WASZCZYNSKI, N.; VIANA, E. S.; MATSUURA, F. C.; MATSUURA, M. I. S. F. In: LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2012, p. 197-204.

GUEDES, Vanessa Rodrigues. **Estudo das atividades antimicrobianas dos extratos dos fungos *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *Trichoderma stromaticum* e *Xylaria* spp., e estudo químico de exemplares de *Xylaria* spp.** 2011. 274 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119-136, 2017.

HARMAN, G.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HWANG, A. Y.; GUMS, J. G. The emergence and evolution of antimicrobial resistance: Impact on a global scale. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6440-6445, 2016.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

IGHODARO, O. M. Evaluation study on Nigerian species of *Musa paradisiaca* peels: phytochemical screening, proximate analysis, mineral composition and antimicrobial activities. **Researcher**, v. 4, n. 8, p. 17-20, 2012.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

ISHII, T.; NONAKA, K.; SUGA, T.; MASUMA, R.; OMURA, S.; SHIOMI, K. Cytosporone S with antimicrobial activity, isolated from the fungus *Trichoderma* sp. FKI-6626. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 3, p. 679-681, 2013.

JAIN, P.; BHUIYAN, M. H.; HOSSAIN, K. R.; BACHAR, S. C. Antibacterial and antioxidant activities of local seeded banana fruits. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 1398-1403, 2011.

JAWLA, S.; KUMAR, Y.; KHAN, M. S. Y. Antimicrobial and antihyperglycemic activities of *Musa paradisiaca* flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 914-918, 2012.

KARADI, R. V.; SHAH, A.; PAREKH, P.; AZMI, P. Antimicrobial activities of *Musa paradisiaca* and *Cocos nucifera*. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 264-267, 2011.

KARUPPIAH, P.; MUSTAFFA, M. Antibacterial and antioxidant activities of *Musa* sp. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 9, p. 737-742, 2013.

KHAN, M. T.; BRULE, M.; MAURER, C.; ARGYROPOULOS, D.; MULLER, J.; OECHSNER, H. Batch anaerobic digestion of banana waste - energy potential and modelling of methane production kinetics. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, v. 18, n. 1, p. 110-128, 2016.

KRAUSE, J.; TOBIN, G. Discovery, development, and regulation of natural products. In: KULKA, M. (ed.). **Using Old Solutions to New Problems – Natural Drug Discovery in the 21 Century**. InTech, 2013, p. 3-35.

LEELAVATHI, M. S.; VANI, L.; REENA, P. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 96-103, 2014.

- LEITE, Sarah Santana. **Influência de fatores abióticos no crescimento e esporulação de isolados geneticamente distintos de *Trichoderma stromaticum***. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2012.
- LEYLAIE, S.; ZAFARI, D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1484, p. 1-16, 2018.
- LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2012.
- LIMA, M. F. P.; BORGES, M. A.; PARENTE, R. S.; JÚNIOR, R. C. V.; OLIVEIRA, M. E. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. **Uningá**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.
- LINO, P. B.; CORREA, C. F.; ARCHONDO, M. E. D. L.; DELLOVA, D. C. A. L. Evaluation of post-surgical healing in rats using a topical preparation based on extract of *Musa sapientum* epicarp. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 491-196, 2011.
- MACHADO, D. F. M.; PARCIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, C. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MANHAES, Jonathan Henrique Carvalho. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Cochliobolus sativus* para a produção de compostos antimicrobianos**. 2015. 31 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- MOREIRA, Mirna Giselle. **Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- NARENDRAN, R.; KATHIRESAN, K. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove-derived *Trichoderma* species against human and fish pathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 189-194, 2016.
- PADAM, B. S.; TIN, H. S.; CHYE, F. Y.; ABDULLAH, M. I. Antibacterial and antioxidative activities of the various solvent extracts of banana (*Musa paradisiaca* cv. Mysore) inflorescences. **Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 2, p. 62-73, 2012.
- PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: Action to combat the rising microbial challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 25-28, 2013.
- PARASHAR, S.; SHARMA, H.; GARG, M. Antimicrobial and antioxidant activities of fruits and vegetable peels: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 1, p. 160-164, 2014.

- PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015.
- PEREIRA, A.; MARASCHIN, M. Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 149-163, 2015.
- PERREIER, X.; LANGHE, E.; DONOHUE, M.; LENTFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY, J. P.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, A. M.; TOMKPE, K.; DOUTRELEPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; MARET, P.; DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 28, p. 11311-11318, 2011.
- PHUPIEWKHAM, W.; SIRITHORN, P.; SAKSIRIRAT, W.; THAMMASIRIRAK, S. Antibacterial agents from *Trichoderma harzianum* strain T9 against pathogenic bacteria. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 42, n. 2, p. 304-316, 2015.
- PIMENTEL, P. R. S.; ROCHA JUNIOR, V. R.; MELO, M. T. P.; RUAS, J. R. M.; BRANT, L. M. S.; COSTA, N. M.; LEITE, G. D. O.; LEITE, M. D. O.; MARANHÃO, C. M. A. Banana peel in the diet for F1 Holstein x Zebu cows. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 969-980, 2017.
- PIRES, I. M. O.; SILVA, A. V.; SANTOS, M. G. S.; BEZERRA, J. D. P.; BARBOSA, R. N.; SILVA, D. C. V.; SVEDESE, V. M.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PAIVA, L. M. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da caatinga, uma floresta tropical seca no nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, n. 9, v. 2, p. 155-161, 2015.
- RADIĆ, N.; BRATKOVIČ, T. (2012). Future antibiotic agents: turning to nature for inspiration, **Antimicrobial Agents**, Dr. Varaprasad Bobbarala (Ed.). Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/antimicrobial-agents/future-antibiotic-agents-turning-to-nature-for-inspiration>. Acesso em: 27 jun de 2017.
- RAMOS, H. P.; SAID, S. Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 443-449, 2011.
- RANG, H. P. **Fármacos usados na quimioterapia antimicrobiana**. In: _____. Rang & Dale: Farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- RATTI, R. P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.
- SAAD, A. M. Determination of secondary metabolites products by *Trichoderma harzianum* and evaluate antimicrobial activity. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 105-122, 2016.

SADYKOVA, V. S.; KURAKOV, A. V.; KUVARINA, A. E.; ROGOZHIN, E. A. Antimicrobial activity of fungi strains of *Trichoderma* from middle Siberia. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 355-361, 2015.

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **Japan Medical Association Journal**, v. 52, n. 2, p. 103-108, 2009.

SALEEM, M.; SAEED, M. T. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. **Journal of King Saud University – Science**, p. 1-6, 2019.

SALEH, R. M.; KABLI, S. A.; AL-GARNI, S. M.; MOHAMED, S. A. Screening and production of antibacterial compound from *Trichoderma* spp. against human-pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 13, p. 1619-1628, 2011.

SANTOS, S. S.; AUGUSTO, D. G.; ALVES, P. A. C.; PEREIRA, J. S.; DUARTE, L. M. B.; MELO, P. C.; GROSS, E.; KANETO, C. M.; SILVA, A.; SANTOS, J. L. *Trichoderma asperelloides* ethanolic extracts efficiently inhibit *Staphylococcus* growth and biofilm formation. **Plos One**, v. 13, n. 8, p. 1-12, 2018.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1753–1760, 2009.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SHENTU, X.; LIU, W.; ZHAN, X.; YU, X.; ZHANG, C. The elicitation effect of pathogenic fungi on trichodermin production by *Trichoderma brevicompactum*. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

SHENTU, X.; ZHAN, X.; MA, Z.; YU, X.; ZHANG, C. Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 248-254, 2014.

SHI, M.; WANG, H.; XIE, S.; LUO, Y.; SUN, C.; CHEN, X.; ZHANG, Y. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated Apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 26, p. 9-26 2010.

SHI, M.; CHEN, L.; WANG, X.; ZHANG, T.; ZHAO, P.; SONG, X.; SUN, C.; CHEN, X.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 166-175, 2012.

SILVA, S. O.; NETO, F. P. L. In: LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2012, p. 15-19.

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*; In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P., **Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics**. Londres: Taylor & Francis, 1998, p. 139-191.

SOUZA, Sirley Cristina de. **Crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina a em meio de cultura sintético e a base de produtos agrícolas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SRIVASTAVA, M.; SHAHID, M.; PANDEY, S.; SINGH, A.; KUMAR, V.; GUPTA, S.; MAURYA, M. *Trichoderma* genome to genomics: a review. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 1-4, 2014.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 9-19, 2009.

SZABÓ, M.; CSEPREGLI, K.; GALBER, M.; VIRÁNYI, F.; FEKETE, C. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism. **Biological Control**, v. 63, n. 2, p. 121-128, 2012.

THEURETZBACHER, U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 295-299, 2012.

TIBOLLA, H.; PELISSARI, F. M.; MENEGALLI, F. C. Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1311-1318, 2014.

TIJERINO, A.; CARDOZA, R. E.; MORAGA, J.; MALMIERCA, M. G.; VICENTE, F.; ALEU, J.; COLLADO, I. G.; GUTIERREZ, S.; MONTE, E.; HERMOSA, R. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. **Fungal genetics and Biology**, v. 48, n. 3, p. 285-296, 2011.

VALARMATHY, K.; GOKULAKRISHNAN, M.; KAUSAR, M. S.; PAUL, K. A study of antimicrobial activity of ethanolic extracts of various plant leaves against selected microbial species. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1, n. 8, p. 293-295, 2010.

YANG, Z.; YU, Z.; LEI, L.; XIA, Z.; SHAO, L.; ZHANG, K.; LI, G. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, n. 4, p. 647-650, 2012.

ZAFAR, I. M.; SALEHA, A.; HOQUE, M. M. E.; SOHEL, R. M. Antimicrobial and cytotoxic properties of different extracts of *Musa sapientum* L. subsp. *sylvestris*. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 8, p. 62-65, 2011.

ZAWAWY, N. A. E. Antioxidant, antitumor, antimicrobial studies and quantitative phytochemical estimation of ethanolic extracts of selected fruit peels. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 298-309, 2015.

ZEILINGER, S.; GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* e chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.

ZURITA, J.; MEJÍA, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina na América Latina. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, supl. 2, p. 97-107, 2010.

APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS NA LEITURA DE CRESCIMENTO MICROBIANO EM LEITOR DE MICROPLACA (595 NM) PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FILTRADOS DE *Trichoderma* spp.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0274					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,0	0,001	0,0	0,0	0,004	0,0
2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,62	0,0	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0
0,31	0,144	0,161	0,15	0,0	0,0	0,0
0,16	0,232	0,278	0,241	0,122	0,167	0,168
0,08	0,321	0,29	0,24	0,227	0,219	0,23
Controle patógeno	0,436	0,413	0,368	0,436	0,413	0,368

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0274											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,001	0,012	0,008	0,008	0,0	0,002	0,021	0,007	0,013	0,003	0,011	0,014
3,75	0,005	0,004	0,003	0,0	0,0	0,0	0,0	0,001	0,005	0,0	0,002	0,0
1,87	0,004	0,005	0,005	0,011	0,008	0,005	0,0	0,002	0,002	0,0	0,0	0,0
0,94	0,022	0,043	0,045	0,066	0,05	0,049	0,011	0,02	0,012	0,097	0,08	0,073
0,47	0,11	0,086	0,092	0,388	0,271	0,262	0,142	0,086	0,109	0,099	0,116	0,182
0,23	0,126	0,091	0,107	0,356	0,411	0,322	0,348	0,28	0,258	0,307	0,318	0,327
0,12	0,104	0,113	0,121	0,472	0,423	0,452	0,319	0,419	0,35	0,284	0,292	0,362
Controle patógeno	0,084	0,121	0,13	0,084	0,121	0,13	0,084	0,121	0,13	0,084	0,121	0,13

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0318					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,002	0,003	0,0	0,0	0,006	0,004
2,5	0,0	0,001	0,0	0,0	0,001	0,002
1,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,002	0,004
0,62	0,0	0,011	0,02	0,0	0,01	0,004
0,31	0,162	0,117	0,107	0,002	0,004	0,015
0,16	0,203	0,185	0,23	0,093	0,124	0,153
0,08	0,263	0,254	0,239	0,123	0,159	0,176
Controle patógeno	0,232	0,192	0,202	0,232	0,192	0,202

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0318											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,004	0,0	0,001	0,0	0,0	0,03	0,022	0,028	0,026	0,0	0,011	0,0
3,75	0,004	0,0	0,0	0,0	0,021	0,025	0,003	0,006	0,001	0,004	0,002	0,002
1,87	0,005	0,004	0,001	0,0	0,007	0,01	0,004	0,003	0,002	0,0	0,0	0,0
0,94	0,177	0,109	0,12	0,144	0,155	0,135	0,013	0,014	0,01	0,005	0,015	0,004
0,47	0,068	0,105	0,118	0,169	0,165	0,182	0,148	0,141	0,179	0,106	0,131	0,191
0,23	0,104	0,102	0,152	0,135	0,12	0,136	0,163	0,168	0,175	0,175	0,175	0,181
0,12	0,105	0,079	0,098	0,238	0,192	0,177	0,129	0,139	0,146	0,138	0,154	0,176
Controle patógeno	0,088	0,096	0,103	0,088	0,096	0,103	0,088	0,096	0,103	0,088	0,096	0,103

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0319					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,004	0,002	0,0	0,0	0,0	0,0
2,5	0,0	0,001	0,0	0,0	0,002	0,0
1,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,62	0,0	0,004	0,006	0,0	0,001	0,0
0,31	0,04	0,046	0,046	0,0	0,0	0,0
0,16	0,093	0,146	0,144	0,0	0,0	0,0
0,08	0,145	0,112	0,134	0,166	0,14	0,125
Controle patógeno	0,217	0,202	0,207	0,217	0,202	0,207

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0319											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,006	0,0	0,0	0,0	0,004	0,003	0,0	0,0	0,0	0,012	0,008	0,0
3,75	0,006	0,0	0,0	0,006	0,041	0,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,002	0,0
1,87	0,002	0,002	0,005	0,014	0,013	0,013	0,0	0,0	0,0	0,0	0,022	0,0
0,94	0,132	0,154	0,17	0,247	0,216	0,215	0,0	0,002	0,001	0,005	0,001	0,002
0,47	0,198	0,228	0,197	0,287	0,278	0,265	0,249	0,225	0,181	0,219	0,215	0,177
0,23	0,145	0,182	0,263	0,378	0,404	0,4	0,315	0,321	0,313	0,269	0,303	0,251
0,12	0,158	0,187	0,255	0,454	0,476	0,498	0,46	0,445	0,549	0,287	0,33	0,379
Controle patógeno	0,093	0,113	0,113	0,093	0,113	0,113	0,093	0,113	0,113	0,217	0,202	0,207

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0320					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,032	0,039	0,039	0,005	0,01	0,015
2,5	0,008	0,013	0,011	0,015	0,013	0,016
1,25	0,003	0,004	0,018	0,005	0,004	0,006
0,62	0,06	0,082	0,073	0,0	0,0	0,002
0,31	0,312	0,25	0,278	0,002	0,003	0,002
0,16	0,372	0,331	0,338	0,277	0,267	0,202
0,08	0,45	0,389	0,4	0,466	0,518	0,454
Controle patógeno	0,582	0,635	0,639	0,582	0,635	0,639

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0320											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,001	0,0	0,0	0,05	0,05	0,041	0,002	0,0	0,013	0,015	0,027	0,026
3,75	0,0	0,0	0,0	0,039	0,037	0,034	0,012	0,034	0,026	0,007	0,003	0,005
1,87	0,003	0,001	0,006	0,045	0,017	0,009	0,01	0,008	0,014	0,005	0,007	0,005
0,94	0,008	0,01	0,008	0,465	0,265	0,212	0,251	0,267	0,241	0,024	0,063	0,047
0,47	0,007	0,067	0,09	0,503	0,328	0,254	0,222	0,217	0,253	0,153	0,171	0,162
0,23	0,279	0,314	0,358	0,423	0,363	0,36	0,304	0,292	0,324	0,394	0,443	0,383
0,12	0,548	0,565	0,62	0,921	0,778	0,73	0,644	0,648	0,653	0,639	0,683	0,721
Controle patógeno	0,582	0,635	0,639	0,582	0,635	0,639	0,582	0,635	0,639	0,582	0,635	0,639

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0321					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,0	0,006	0,0	0,0	0,0	0,0
2,5	0,0	0,003	0,007	0,0	0,0	0,0
1,25	0,0	0,004	0,0	0,0	0,0	0,0
0,62	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,31	0,203	0,203	0,17	0,0	0,0	0,0
0,16	0,237	0,198	0,172	0,145	0,121	0,193
0,08	0,226	0,198	0,167	0,19	0,247	0,262
Controle patógeno	0,34	0,281	0,280	0,34	0,281	0,280

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0321											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,011	0,0	0,0	0,065	0,039	0,074	0,003	0,0	0,011	0,0	0,0	0,0
3,75	0,001	0,0	0,0	0,01	0,007	0,009	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,87	0,0	0,0	0,006	0,133	0,07	0,082	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,001
0,94	0,0	0,0	0,0	0,102	0,118	0,123	0,107	0,129	0,191	0,091	0,172	0,134
0,47	0,053	0,062	0,053	0,120	0,127	0,133	0,113	0,113	0,141	0,165	0,26	0,198
0,23	0,175	0,18	0,21	0,191	0,183	0,184	0,096	0,092	0,103	0,267	0,235	0,252
0,12	0,188	0,187	0,255	0,26	0,269	0,274	0,247	0,295	0,308	0,356	0,345	0,333
Controle patógeno	0,122	0,149	0,106	0,122	0,149	0,106	0,122	0,149	0,106	0,122	0,149	0,106

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0323					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,004	0,012	0,001	0,0	0,0	0,02
2,5	0,0	0,008	0,0	0,0	0,0	0,0
1,25	0,0	0,026	0,012	0,0	0,0	0,0
0,62	0,037	0,005	0,047	0,0	0,0	0,0
0,31	0,150	0,125	0,124	0,059	0,049	0,117
0,16	0,165	0,174	0,225	0,143	0,144	0,17
0,08	0,154	0,182	0,141	0,135	0,152	0,165
Controle patógeno	0,214	0,188	0,225	0,214	0,188	0,225

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0323											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,004	0,0	0,0	0,05	0,039	0,04	0,012	0,007	0,048	0,01	0,023	0,009
3,75	0,0	0,0	0,0	0,005	0,005	0,008	0,017	0,01	0,025	0,002	0,005	0,0
1,87	0,004	0,003	0,004	0,004	0,008	0,009	0,04	0,082	0,084	0,0	0,0	0,0
0,94	0,006	0,009	0,008	0,116	0,098	0,148	0,27	0,303	0,262	0,0	0,003	0,0
0,47	0,059	0,045	0,093	0,278	0,296	0,293	0,312	0,333	0,393	0,084	0,123	0,089
0,23	0,152	0,12	0,115	0,282	0,355	0,267	0,33	0,351	0,412	0,291	0,311	0,335
0,12	0,068	0,122	0,125	0,208	0,196	0,232	0,306	0,347	0,313	0,335	0,354	0,412
Controle patógeno	0,226	0,268	0,311	0,226	0,268	0,311	0,226	0,268	0,311	0,226	0,268	0,311

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0325					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,004	0,004	0,004	0,001	0,0	0,007
2,5	0,0	0,0	0,0	0,003	0,0	0,0
1,25	0,002	0,006	0,004	0,006	0,006	0,007
0,62	0,123	0,108	0,09	0,021	0,04	0,005
0,31	0,229	0,274	0,225	0,101	0,079	0,11
0,16	0,179	0,245	0,277	0,142	0,132	0,154
0,08	0,193	0,232	0,278	0,34	0,493	0,274
Controle patógeno	0,481	0,494	0,53	0,481	0,494	0,53

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0325											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,004	0,011	0,0	0,05	0,05	0,046	0,0	0,005	0,006	0,001	0,0	0,0
3,75	0,0	0,003	0,0	0,01	0,01	0,01	0,0	0,0	0,0	0,003	0,003	0,005
1,87	0,017	0,007	0,014	0,278	0,282	0,174	0,0	0,002	0,0	0,0	0,001	0,006
0,94	0,001	0,0	0,004	0,553	0,445	0,485	0,094	0,081	0,092	0,121	0,14	0,123
0,47	0,116	0,116	0,111	0,711	0,609	0,542	0,373	0,27	0,266	0,554	0,471	0,56
0,23	0,307	0,359	0,295	0,87	0,7	0,653	0,522	0,507	0,526	0,621	0,628	0,668
0,12	0,4	0,377	0,396	0,989	1,0	0,939	0,798	0,774	0,749	0,857	0,834	0,967
Controle patógeno	0,481	0,494	0,53	0,481	0,494	0,53	0,481	0,494	0,53	0,481	0,494	0,53

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0326					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,014	0,02	0,016	0,009	0,006	0,013
2,5	0,005	0,007	0,009	0,007	0,003	0,006
1,25	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007	0,009
0,62	0,341	0,242	0,242	0,0	0,006	0,005
0,31	0,436	0,382	0,365	0,152	0,129	0,177
0,16	0,515	0,493	0,501	0,354	0,359	0,352
0,08	0,666	0,567	0,541	0,494	0,495	0,501
Controle patógeno	0,637	0,678	0,818	0,637	0,678	0,818

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0326											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,0	0,013	0,0	0,003	0,0	0,017	0,023	0,033	0,032	0,01	0,01	0,026
3,75	0,003	0,001	0,002	0,023	0,029	0,019	0,035	0,039	0,04	0,02	0,01	0,026
1,87	0,003	0,002	0,002	0,35	0,365	0,402	0,05	0,05	0,045	0,026	0,025	0,035
0,94	0,107	0,121	0,198	0,43	0,484	0,51	0,538	0,516	0,458	0,158	0,185	0,23
0,47	0,23	0,241	0,231	0,473	0,512	0,505	0,461	0,427	0,448	0,548	0,528	0,551
0,23	0,484	0,463	0,608	0,567	0,56	0,576	0,476	0,488	0,501	0,624	0,713	0,798
0,12	0,502	0,571	0,635	0,831	0,746	0,698	0,664	0,622	0,644	0,716	0,802	0,8
Controle patógeno	0,637	0,678	0,818	0,637	0,678	0,818	0,637	0,678	0,818	0,637	0,678	0,818

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0327					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,014	0,013	0,012	0,004	0,006	0,024
2,5	0,004	0,005	0,002	0,0	0,0	0,002
1,25	0,006	0,006	0,007	0,001	0,005	0,002
0,62	0,01	0,008	0,007	0,001	0,008	0,0
0,31	0,147	0,155	0,2	0,0	0,0	0,0
0,16	0,136	0,121	0,15	0,057	0,046	0,056
0,08	0,117	0,105	0,116	0,19	0,16	0,178
Controle patógeno	0,101	0,113	0,085	0,101	0,113	0,085

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0327											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,009	0,004	0,0	0,007	0,014	0,006	0,025	0,028	0,026	0,013	0,01	0,0
3,75	0,002	0,002	0,005	0,0	0,0	0,0	0,009	0,016	0,008	0,006	0,004	0,002
1,87	0,0	0,0	0,005	0,064	0,031	0,043	0,057	0,058	0,062	0,001	0,002	0,002
0,94	0,002	0,0	0,001	0,162	0,187	0,162	0,246	0,151	0,169	0,0	0,0	0,0
0,47	0,0	0,001	0,0	0,13	0,147	0,114	0,105	0,168	0,138	0,015	0,054	0,054
0,23	0,0	0,003	0,002	0,097	0,074	0,1	0,155	0,176	0,155	0,099	0,11	0,103
0,12	0,149	0,144	0,157	0,204	0,199	0,134	0,153	0,153	0,092	0,073	0,081	0,134
Controle patógeno	0,101	0,113	0,085	0,101	0,113	0,085	0,101	0,113	0,085	0,101	0,113	0,085

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 80958					
	F1	F1	F1	F2	F2	F2
5,0	0,011	0,006	0,007	0,0	0,006	0,014
2,5	0,001	0,004	0,004	0,0	0,001	0,0
1,25	0,002	0,001	0,003	0,0	0,0	0,004
0,62	0,13	0,194	0,133	0,0	0,0	0,0
0,31	0,197	0,207	0,16	0,093	0,09	0,129
0,16	0,26	0,22	0,272	0,14	0,151	0,182
0,08	0,301	0,347	0,309	0,335	0,29	0,244
Controle patógeno	0,441	0,339	0,33	0,441	0,339	0,33

F1: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, ausência de luz, pH 5,0;

F2: *Trichoderma* sp. CFAM 0767 em BD, muita luz, pH 5,0.

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 80958											
	F3	F3	F3	F4	F4	F4	F5	F5	F5	F6	F6	F6
7,5	0,031	0,014	0,0	0,014	0,028	0,049	0,005	0,041	0,027	0,0	0,008	0,009
3,75	0,004	0,003	0,0	0,016	0,028	0,042	0,033	0,036	0,049	0,005	0,001	0,005
1,87	0,003	0,0	0,0	0,107	0,074	0,06	0,116	0,156	0,123	0,0	0,003	0,002
0,94	0,0	0,0	0,0	0,158	0,136	0,128	0,262	0,349	0,27	0,092	0,088	0,08
0,47	0,047	0,049	0,051	0,3	0,234	0,215	0,436	0,405	0,364	0,246	0,159	0,176
0,23	0,187	0,211	0,278	0,326	0,44	0,379	0,351	0,421	0,338	0,434	0,37	0,419
0,12	0,193	0,241	0,246	0,379	0,383	0,363	0,318	0,37	0,354	0,367	0,33	0,429
Controle patógeno	0,441	0,339	0,33	0,441	0,339	0,33	0,441	0,339	0,33	0,441	0,339	0,33

F3: *T. harzianum* CFAM 1155 em BD, ausência de luz, pH 5,0; **F4:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 5,0;

F5: *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, muita luz, pH 5,0; **F6:** *Trichoderma* sp. CFAM 0235 em Farelo de trigo, ausência de luz, pH 7,0.

APÊNDICE B – RESULTADOS OBTIDOS NA LEITURA DE CRESCIMENTO MICROBIANO EM LEITOR DE MICROPLACA (595 NM) PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE EXTRATOS AQUOSOS DE BANANA (*Musa spp.*)

<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0274										
Concentrações (mg/mL)	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Concentrações (mg/mL)	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min
5	0,202	0,218	0,257	20	0,0	0,0	0,008	0,06	0,03	0,0
2,5	0,048	0,033	0,055	10	0,013	0,0	0,05	0,019	0,026	0,012
1,25	0,024	0,033	0,036	5	0,0	0,0	0,003	0,0	0,0	0,0
0,62	0,113	0,179	0,173	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,31	0,296	0,338	0,251	1,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,15	0,3	0,256	0,25	0,62	0,087	0,087	0,104	0,0	0,0	0,0
0,08	0,442	0,422	0,322	0,31	0,186	0,181	0,228	0,216	0,27	0,386
Controle patógeno	0,43	0,395	0,496	Controle patógeno	0,182	0,204	0,32	0,182	0,204	0,32

<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0318										
Concentrações (mg/mL)	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Concentrações (mg/mL)	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min
5	0,016	0,0	0,0	20	0,001	0,002	0,034	0,05	0,07	0,035
2,5	0,0	0,0	0,0	10	0,0	0,0	0,0	0,014	0,007	0,003
1,25	0,186	0,206	0,132	5	0,0	0,0	0,009	0,028	0,02	0,033
0,62	0,129	0,234	0,208	2,5	0,0	0,0	0,0	0,042	0,041	0,034
0,31	0,436	0,477	0,385	1,25	0,074	0,101	0,109	0,174	0,172	0,161
0,15	0,439	0,358	0,468	0,62	0,117	0,129	0,141	0,149	0,184	0,136
0,08	0,47	0,39	0,467	0,31	0,15	0,129	0,126	0,159	0,194	0,236
Controle patógeno	0,413	0,372	0,403	Controle patógeno	0,128	0,157	0,254	0,128	0,157	0,254

<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0319										
Concentrações (mg/mL)	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Concentrações (mg/mL)	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min
5	0,018	0,045	0,055	20	0,0	0,004	0,002	0,0	0,024	0,0
2,5	0,032	0,025	0,0	10	0,012	0,0	0,016	0,05	0,04	0,022
1,25	0,0	0,0	0,0	5	0,003	0,004	0,001	0,045	0,036	0,021
0,62	0,193	0,138	0,155	2,5	0,001	0,004	0,0	0,024	0,008	0,0
0,31	0,364	0,463	0,386	1,25	0,0	0,013	0,005	0,002	0,0	0,0
0,15	0,472	0,505	0,589	0,62	0,025	0,003	0,012	0,009	0,004	0,005
0,08	0,629	0,643	0,606	0,31	0,1	0,158	0,169	0,168	0,19	0,233
Controle patógeno	0,69	0,6	0,774	Controle patógeno	0,253	0,286	0,342	0,253	0,286	0,342

<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0320										
Concentrações (mg/mL)	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Concentrações (mg/mL)	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min
5	0,043	0,0	0,0	10	0,0	0,0	0,0	0,026	0,0	0,0
2,5	0,0	0,0	0,0	5	0,005	0,001	0,006	0,009	0,0	0,0
1,25	0,0	0,0	0,0	2,5	0,006	0,005	0,006	0,0	0,0	0,0
0,62	0,238	0,203	0,296	1,25	0,0	0,004	0,005	0,001	0,0	0,0
0,31	0,434	0,407	0,446	0,62	0,0	0,0	0,011	0,0	0,0	0,0
0,15	0,338	0,318	0,306	0,31	0,075	0,069	0,082	0,182	0,134	0,146
0,08	0,457	0,429	0,323	0,15	0,083	0,139	0,176	0,244	0,202	0,239
Controle patógeno	0,474	0,41	0,392	Controle patógeno	0,241	0,24	0,354	0,241	0,24	0,354

<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0321										
Concentrações (mg/mL)	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Concentrações (mg/mL)	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min
5	0,0	0,001	0,0	10	0,0	0,028	0,034	0,0	0,0	0,003
2,5	0,0	0,018	0,012	5	0,005	0,0	0,009	0,004	0,0	0,0
1,25	0,079	0,123	0,11	2,5	0,002	0,002	0,005	0,009	0,007	0,0
0,62	0,351	0,383	0,394	1,25	0,015	0,05	0,066	0,006	0,007	0,004
0,31	0,441	0,496	0,443	0,62	0,06	0,074	0,083	0,084	0,086	0,099
0,15	0,444	0,47	0,431	0,31	0,09	0,088	0,062	0,209	0,287	0,222
0,08	0,583	0,525	0,741	0,15	0,122	0,1	0,13	0,211	0,231	0,244
Controle patógeno	0,485	0,613	0,69	Controle patógeno	0,293	0,321	0,307	0,293	0,321	0,307

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0323								
	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min
5	0,0	0,0	0,0	0,011	0,008	0,012	0,005	0,0	0,0
2,5	0,005	0,023	0,026	0,264	0,274	0,256	0,008	0,008	0,0
1,25	0,168	0,161	0,124	0,386	0,544	0,561	0,308	0,324	0,343
0,62	0,414	0,403	0,382	0,525	0,423	0,499	0,548	0,491	0,556
0,31	0,523	0,496	0,433	0,511	0,43	0,463	0,527	0,557	0,598
0,15	0,347	0,318	0,331	0,554	0,521	0,521	0,602	0,593	0,685
0,08	0,477	0,418	0,448	0,619	0,652	0,587	0,619	0,637	0,795
Controle patógeno	0,262	0,327	0,262	0,262	0,327	0,262	0,262	0,327	0,262

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0325								
	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,002	0,006	0,025	0,013	0,0
2,5	0,031	0,036	0,051	0,168	0,19	0,25	0,01	0,006	0,0
1,25	0,128	0,157	0,138	0,502	0,534	0,569	0,35	0,317	0,355
0,62	0,225	0,234	0,17	0,484	0,396	0,559	0,466	0,489	0,495
0,31	0,256	0,306	0,203	0,527	0,498	0,467	0,576	0,513	0,646
0,15	0,306	0,35	0,3	0,454	0,512	0,523	0,464	0,361	0,453
0,08	0,401	0,422	0,398	0,466	0,434	0,416	0,401	0,464	0,684
Controle patógeno	0,356	0,375	0,575	0,356	0,375	0,575	0,356	0,375	0,575

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0326								
	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 10 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min	Fresca, <i>Millipore</i> , 20 min
5	0,0	0,0	0,0	0,011	0,005	0,01	0,007	0,0	0,0
2,5	0,0	0,025	0,065	0,262	0,268	0,246	0,008	0,008	0,0
1,25	0,153	0,171	0,132	0,376	0,531	0,546	0,304	0,324	0,391
0,62	0,419	0,398	0,385	0,515	0,415	0,485	0,556	0,493	0,585
0,31	0,526	0,395	0,429	0,508	0,415	0,445	0,532	0,559	0,648
0,15	0,448	0,495	0,531	0,553	0,517	0,532	0,614	0,62	0,725
0,08	0,509	0,542	0,568	0,624	0,65	0,584	0,65	0,687	0,839
Controle patógeno	0,606	0,662	0,698	0,606	0,662	0,698	0,606	0,662	0,698

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> CBAM 0327								
	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min
5	0,065	0,079	0,054	0,009	0,008	0,012	0,006	0,0	0,0
2,5	0,082	0,095	0,101	0,002	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,25	0,046	0,046	0,053	0,002	0,003	0,005	0,004	0,0	0,0
0,62	0,011	0,017	0,011	0,008	0,009	0,002	0,0	0,0	0,0
0,31	0,181	0,098	0,087	0,105	0,106	0,07	0,067	0,068	0,113
0,15	0,21	0,212	0,126	0,11	0,125	0,114	0,083	0,131	0,161
0,08	0,282	0,236	0,222	0,322	0,234	0,259	0,136	0,16	0,136
Controle patógeno	0,198	0,177	0,243	0,198	0,177	0,243	0,198	0,177	0,243

Concentrações (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> atcc 80958								
	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Batida, autoclave, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 10 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min	Fresca, Millipore, 20 min
5	0,314	0,264	0,213	0,001	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2,5	0,0	0,0	0,0	0,034	0,117	0,131	0,006	0,0	0,0
1,25	0,0	0,0	0,0	0,119	0,151	0,151	0,106	0,119	0,16
0,62	0,121	0,213	0,177	0,244	0,267	0,469	0,192	0,112	0,18
0,31	0,268	0,222	0,192	0,402	0,319	0,387	0,299	0,242	0,211
0,15	0,313	0,219	0,228	0,373	0,363	0,329	0,517	0,565	0,559
0,08	0,334	0,358	0,385	0,313	0,329	0,373	0,465	0,43	0,532
Controle patógeno	0,264	0,224	0,304	0,264	0,224	0,304	0,264	0,224	0,304