



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KARLA CAROLINA PAIVA BOCATE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE  
NANOPARTÍCULA DE PRATA BIOGÊNICA E  
SINVASTATINA CONTRA DIFERENTES *Aspergillus* sp.**

---

Londrina  
2016

KARLA CAROLINA PAIVA BOCATE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE  
NANOPARTÍCULA DE PRATA BIOGÊNICA E  
SINVASTATINA CONTRA DIFERENTES *Aspergillus* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio.

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bocate, Karla Carolina Paiva.

Avaliação da Atividade Antifúngica de Nanopartícula de Prata Biogênica e Sinvastatina Contra Diferentes *Aspergillus* sp. / Karla Carolina Paiva Bocate. - Londrina, 2016.  
65 f. : il.

Orientador: Luciano Aparecido Panagio .

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Micotoxinas - Teses. 2. *Aspergillus* - Teses. 3. Sinvastatina - Teses. 4. Nanopartícula de Prata Biogênica - Teses. I. Panagio , Luciano Aparecido. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

KARLA CAROLINA PAIVA BOCATE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULA  
DE PRATA BIOGÊNICA E SINVASTATINA CONTRA DIFERENTES  
*Aspergillus sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido  
Panagio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -  
PUCPR

Londrina, 31 de março de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família, em especial minha mãe Edna e meu pai José que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, e sempre estiveram presentes nesta longa jornada.

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso teria sido possível, sempre me dando força e fé de que tudo iria dar certo.

Ao meu namorado e companheiro de laboratório, Guilherme Reis. Que sempre foi fonte de força, alegria e dedicação para a realização do mestrado como um todo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Panagio, que me acompanha desde a graduação e agora durante o mestrado. Sempre disposto a ajudar, foi ele quem me ajudou a crescer dentro da microbiologia, e me ensinou grande parte do que aprendi.

Ao Prof.Dr. Ricardo Almeida e a todos os professores que me ajudaram nessa jornada, e contribuíram com excelência para minha formação como mestre.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório NIP 9, sempre dispostos a ajudar, alegrar os dias de experimentos, ajudando um ao outro sempre que possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, sem esse apoio não seria possível minha dedicação exclusiva ao trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em microbiologia da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de conhecer incríveis profissionais que muito contribuíram para minha formação. E à Universidade Estadual de Londrina por me acolher, fornecer espaço e a oportunidade de crescer profissionalmente e como pessoa, tanto na graduação como na pós graduação.

“A mente que se abre a uma nova  
ideia jamais voltará ao seu tamanho  
original.”

Albert Einstein

BOCATE, Karla Carolina Paiva. **Avaliação Antifúngica de Nanopartícula de Prata Biogênica e Sinvastatina contra diferentes *Aspergillus* sp.** 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brasil, 2016.

## RESUMO

O Brasil é um dos países com maior produtividade agrícola do mundo. Entretanto, o cultivo no país sofre ação de agentes patógenos que prejudicam a qualidade da colheita. Dentre eles, estão fungos fitopatógenos do gênero *Aspergillus*, que agem sobre os produtos no pós colheita, armazenados em silos, moinhos, locais de manipulação e estocagem na pré-venda. A principal implicação destes organismos é a produção de micotoxinas, metabólitos tóxicos a seres humanos e outros animais. As toxinas muitas vezes não alteram as características físicas ou organolépticas dos alimentos, mas sempre apresentam potencial de dano. As micotoxinas podem ser carcinogênicas, mutagênicas, hepato e nefrotóxicas e podem causar efeitos imunossupressores, entre outros problemas. Para conter esta produção é importante impedir a germinação dos esporos, o desenvolvimento de hifas (crescimento miceliano). Sendo assim, o intuito desta pesquisa foi a utilização de compostos biogênicos e semi-sintéticos contra fungos toxigênicos: nanopartícula de prata e a sinvastatina, respectivamente. A sinvastatina é uma estatina empregada na terapêutica hipolipemiante. Atua como competidora do sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase, envolvida na produção de colesterol em mamíferos e na produção de ergosterol nos fungos. As nanopartículas de prata agem em diversos sítios celulares em microrganismos, como na parede celular, grupos fosfato do DNA, citocromos mitocondriais, grupamentos sulfidríla e outras regiões. Testes iniciais como disco e poço difusão em ágar demonstraram a sensibilidade de cinco cepas do gênero *Aspergillus*, sendo esses testes corroborados com a concentração inibitória mínima (CIM) demonstrando sensibilidade dos organismos. Quando os compostos foram utilizados em conjunto a concentração inibitória decaiu entre duas e quatro vezes daquelas observadas na CIM, demonstrando poder sinérgico e aditivo. Testes complementares como concentração fungicida mínima demonstraram que estes compostos são fungicidas entre quatro e oito concentrações superiores a observadas na CIM. Estes compostos também foram capazes inibir a formação de biofilme em placas. Por fim, através de microscopia eletrônica de varredura, pudemos observar mudanças estruturais na forma vegetativa do fungo (hifas truncadas e com perda da estrutura formal) e inibição da germinação dos esporos ou germinação anormal. Estes resultados mostram que nanopartículas de prata e sinvastatina, isoladas e principalmente conjugadas, atuam eficientemente contra fungos toxigênicos, indicando um potencial uso destas drogas em etapas diversas da cadeia de produção alimentar.

**Palavras - chave:** Micotoxinas. Sinvastatina. Nanopartícula de Prata. *Aspergillus*.

BOCATE, Karla Carolina Paiva. **Antifungal Assessment of Silver Biogenic Nanoparticle and Simvastatin Against Different *Aspergillus* sp.** 2016. 65 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brazil, 2016.

## ABSTRACT

Brazil is one of the countries with higher agricultural productivity in the world. However, cultivation in the country suffers action of pathogens that damage crop quality. Among them are phytopathogenic fungi of the *Aspergillus* genus, acting on the products also in post-harvest, stored in silos, mills, handling and storage sites in pre-sales. The main implication of these organisms is the production of mycotoxins, metabolites toxic to animals and humans. These secondary metabolites often do not alter the physical or organoleptic characteristics of the food, but always have potential for harm. Mycotoxins can be carcinogenic, mutagenic, hepato and nephrotoxic and can cause immunosuppressive effects, among other problems. To counter this production is important to prevent germination of the spores, hyphal development (mycelium growth). Thus, the aim of this research is to use natural and semi-synthetic compounds against toxigenic fungi: Silver nanoparticles and simvastatin, respectively. Simvastatin is a statin used in the lipid-lowering therapy. Acts as a competitor of the enzyme HMG-CoA reductase, which is involved in the production of cholesterol in mammals and in the production of ergosterol in fungi. The silver nanoparticles act on many cell sites in microorganisms such as cell wall, DNA phosphate groups, mitochondrial cytochromes, sulfhydryl groups and other regions. Preliminary tests with disc or well diffusion demonstrated the sensitivity of five strains of the genus *Aspergillus*, which was corroborated by other method, MIC (minimum inhibitory concentration). By this means, sensitivity of fungi to the compounds was confirmed. When the compounds are used in conjunction inhibitory concentration has fallen between two and four times regarding values found in MIC, demonstrating synergistic or additive effect. Additional tests as MFC (minimum fungicidal concentration) demonstrated that these compounds are fungicidal between five and ten concentrations greater than observed in CIM. The compounds were also able to reduce or inhibit biofilm formation on polystyrene plates. Finally, by scanning electron microscopy (SEM), we observed structural changes in the vegetative form of the fungus (truncated and loss of formal structure hyphae) and inhibition of germination of spores or abnormal germination. Moreover, it was noted that the test compounds affected the production of extracellular matrix produced by the fungi. These results show that silver nanoparticles and simvastatin, isolated or conjugated, act effectively against toxigenic fungi, indicating a potential use of these drugs in various stages of the food production chain.

**Keywords:** Mycotoxins. Simvastatin. Silver Nanoparticle. *Aspergillus*.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
Abs	Absorbância
AFs	Aflatoxinas
AFB1	Aflatoxina B1
AgNO3	Nitrato de Prata
AgNP	Nanopartícula de Prata
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	centímetros
CoQ	Coenzima Q
DNA	Ácido desoxirribonucléico
G	gramas
H	horas
KCl	Cloreto de Potássio
M	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV	Molar
Min	minutos
Mg	miligramas
mL	mililitros
Mm	milímetros
mM	milimolar
MOPS	[ácido 3-(N morfolino) propanosulfônico]
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
Nm	Nanômetros
°C	Grau Celsius
OTA	Ocratoxina A
PBS	Tampão Fosfato-Salino
RPM	Rotações por Minuto

RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIN	Sinvastatina
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
2.1.	<i>Aspergillus</i> spp. ....	13
2.2.	Infecções causadas por <i>Aspergillus</i> spp. ....	13
2.3.	Intoxicações causadas por <i>Aspergillus</i> spp. ....	14
2.3.1.	<i>Aspergillus flavus</i> .....	14
2.3.2.	<i>Aspergillus parasiticus</i> .....	15
2.3.3.	<i>Aspergillus nomius</i> .....	16
2.3.4.	<i>Aspergillus ochraceus</i> .....	16
2.3.5.	<i>Aspergillus melleus</i> .....	17
2.4.	Estatinas.....	17
2.5.	Atividade antifúngica da sinvastatina.....	18
2.6.	Uso de nanopartículas de prata como antifúngico.....	19
2.7.	Biofilmes como resistência a antifúngicos e alimentos .....	21
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1.	Objetivo geral .....	23
3.2.	Objetivos específicos.....	23
<b>4.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

O número de detecções de casos de doenças provocadas por fungos está aumentando consideravelmente desde o final do século passado. A maioria dos pacientes são imunossuprimidos, como por exemplo, indivíduos diabéticos e com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). A quantidade de pacientes comprometidos imunologicamente também tem aumentado, contribuindo para essa estatística (MISHRA, 2008).

Um dos fatores que tem contribuído potencialmente ao aumento da detecção das doenças fúngicas são às micotoxinas produzidas por alguns gêneros de fungos, em especial *Aspergillus*. As micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular. Elas apresentam efeito tóxico para o homem e outros vertebrados, além de alguns invertebrados, plantas e microrganismos (BENNETT; KLICH, 2003). A principal fonte de intoxicação por micotoxinas se dá por alimentação.

As micotoxinas têm efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, havendo a necessidade de controle na produção de alimentos, cultivo, colheita e transporte (PRADO, 2000). A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas podem causar graves efeitos sobre a saúde humana e de outros animais (PITT, 2000; SHEPHARD, 2008). Tais efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos quais está exposto (PERAICA *et al.*, 2000; BHATNAGAR *et al.*, 2002).

As principais micotoxinas, são as aflatoxinas e as ocratoxinas. A aflatoxina tem recebido grande atenção em comparação com as demais micotoxinas, devido aos efeitos carcinogênicos que podem provocar em animais e o efeito agudo tóxico em seres humanos. As aflatoxinas representam o grupo de micotoxinas com mais resultados positivos em alimentos já relatados (KASNOWSKI *et al.*, 2010). Segundo IARC (International Agency for Research on Cancer) 2010, as micotoxinas podem ser classificadas perante ao risco de causar câncer em humanos e outros animais. As aflatoxinas são classificadas como carcinógenos de grupo 1, ou seja, estas micotoxinas são evidenciadas como causadoras de câncer em humanos

e outros animais. As ocratoxinas são classificadas como 2B, ou seja, as toxinas são possíveis causadores de câncer em humanos e outros animais. Além destas classificações citadas, a IARC classifica as toxinas fúngicas em grupos 2A (prováveis causadores de câncer), 3 (não classificado quanto a sua carcinogenicidade para humanos e 4 (provavelmente não carcinogênico).

Segundo a resolução da ANVISA RDC No. 7 de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos trás que os níveis para aflatoxinas variam de 1 a 20 µg/kg dependendo do tipo de alimentos, como exemplo de 1 µg/kg temos alimentos à base de cereais para alimentação infantil de de 20 µg/kg Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto. Para as ocratoxinas os níveis variam de 2 a 30 µg/kg, sendo o de 2 µg/kg como exemplo, o suco de uva e o de 30 µg/kg as especiarias, como pimentas.

Ocratoxinas são produzidas por espécies de *Aspergillus*, como *Aspergillus ochraceus*, e *Aspergillus melleus* e *Penicillium* presentes em cereais, café e pão. A ocratoxina A é a mais frequente e a mais tóxica. Apresentam efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos (PERAICA *et al.*, 2000; MURPHY *et al.*, 2006).

Infecções causadas por fungos oportunistas são muitas vezes de difícil tratamento e o número de agentes antifúngicos disponíveis é limitado (NYILASI *et al.*, 2010). Além disso, o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos tem sido um importante fator de complicação no tratamento das infecções fúngicas (CURY, 2010). Existem poucos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento dessas enfermidades, e os fungos estão apresentando alta taxa de resistência às drogas usuais. Os principais alvos da terapia antifúngica são: membrana plasmática, parede celular, divisão celular (COSTA, 2010) e síntese ácidos nucléicos e de proteínas (ARMSTRONG, 2009).

A coadministração de dois ou três compostos antifúngicos pode melhorar a eficácia do tratamento, e amplia o espectro de atividade; além disso, a resistência também pode ser evitada e a toxicidade reduzida utilizando concentrações inferiores (NOSANCHUK, 2006).

Baseado na grande incidência de doenças fúngicas e da grande necessidade de conter as micotoxinas que atacam os produtos alimentícios, e conseqüentemente a pequena quantidade de fármacos disponíveis e a grande resistência já existente à eles, este trabalho avaliou novas linhas terapêuticas, como

o uso de uma estatina, a sinvastatina, o uso de nanopartículas de prata, e a combinação para serem utilizadas como potenciais antifúngicos, tanto na indústria farmacêutica, mas também como uma estratégia para a indústria de alimentos, podendo associar estes compostos a embalagens ou pulveriza-los na superfície de produtos ou de silos promovendo assim, um maior “controle das micotoxinas”.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Aspergillus* spp.

Em 1729, Micheli introduziu o nome *Aspergillus* e Haler em 1768 validou o gênero (SAMSON, 2014). A morfologia do gênero *Aspergillus* é muito importante, características como textura, grau de esporulação, cores do micélio, produção de exsudatos, o reverso da colônia, entre outras, são caracteres utilizados para a caracterização de espécies de *Aspergillus* (SAMSON, 2014).

O gênero *Aspergillus* possui grande riqueza podendo ser encontrado em diversos habitats. Ele possui alto impacto social e econômico, deteriorando alimentos, produzindo micotoxinas e sendo frequentemente descritos como patógenos em seres humanos e outros animais. Em contrapartida, muitas espécies são utilizadas na biotecnologia, para a produção de diversos metabólitos, como antibióticos, medicamentos, enzimas, entre outros (SAMSON, 2014).

### 2.2. Infecções causadas por *Aspergillus* spp.

Fungos filamentosos causam infecções, como é o caso de *Aspergillus* spp. Dentre os fungos filamentosos isolados das infecções humanas, o gênero *Aspergillus* é o mais representativo. Algumas das 200 ou mais espécies de *Aspergillus* são patogênicas para o homem, entre elas o *Aspergillus fumigatus*, que é um fungo patógeno oportunista, frequentemente isolado no ambiente hospitalar em pacientes imunossuprimidos (ZAITZ, 2010). A aspergilose invasiva afeta entre 10 e 20% de pacientes com leucemia e entre 5 e 25% de pacientes após o transplante de coração ou de pulmão. A resistência do *Aspergillus* a alguns antifúngicos utilizados clinicamente traz um prognóstico clínico preocupante em pessoas acometidas por aspergilose (CANUTO; RODERO, 2002). A ampla utilização e, por vezes, mal uso de quimio-antimicrobianos na medicina humana e animal tem sido responsável pela seleção de cepas resistentes (DESSELBERGER, 2000; GEORGOPAPADAKOU, 2002).

## 2.3. Intoxicações causadas por *Aspergillus* spp.

### 2.3.1. *Aspergillus flavus*

O *A. flavus* é um fungo presente em solos e contamina sementes nas pré e principalmente na pós colheitas produzindo as aflatoxinas, que são um metabólito secundário (não estão diretamente envolvidos nos processos vitais para a manutenção do microrganismo) que tem se mostrado cancerígeno. O fungo é um patógeno que causa doenças em seres humanos e outros animais através do consumo de alimentos contaminados com as aflatoxinas, podendo causar, por exemplo, aspergilose, muitas vezes fatal em imunocomprometidos e até mesmo câncer de fígado (AMAIKE; KELLER, 2011).

Uma série de aflatoxinas são produzidas por *A. flavus* e linhagens relacionadas, destacando-se B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, e estão entre as micotoxinas mais potentes. As aflatoxinas causam aflatoxicoses, resultante da inalação e ingestão de alimentos contaminados com altos níveis de aflatoxina. Além disso, tem se tornado um grande problema nos países em desenvolvimento, especialmente Ásia e África (YU, 2008).

*A. flavus* é o segundo principal patógeno causando aspergilose invasiva, seguido de *A. fumigatus* (KRISHNAN, 2009). Recentemente, tem sido também relatado casos de ceratite micótica, uma infecção fúngica da córnea. A maioria das infecções humanas surge por inalação de esporos fúngicos.

As aflatoxinas causam danos à saúde conhecida como aflatoxicoses, que é uma doença causada por envenenamento por aflatoxinas, e é distinta da aspergilose, que é uma infecção pelo fungo. O consumo diário de baixas doses de aflatoxinas à longo prazo provoca a aflatoxicose crônica, causando por exemplo supressão imunológica e possível desenvolvimento de câncer de fígado. Por outro lado, aflatoxicoses aguda é causada pela ingestão de elevadas concentrações de aflatoxinas em apenas uma ou algumas exposições (AMAIKE; KELLER, 2011).

A longa exposição à aflatoxina B<sub>1</sub> induz tumores, principalmente de fígado, pois essa toxina é uma potente hepatocarcinogênica. Além de câncer no



fígado essa toxina está ligada a câncer de rim, pulmão e de cólon nos seres humanos e outros animais (GOUAS, 2009).

A virulência do presente patógeno é multifatorial e está intimamente ligada com o desenvolvimento da esporulação e metabolismo secundário, adaptabilidade a condições de estresse, e interceptação de moléculas de sinalização de defesa do hospedeiro (AMAIKE; KELLER, 2011).

### 2.3.2. *Aspergillus parasiticus*

O fungo *A. parasiticus* também é produtor das aflatoxinas, que apresentam propriedades carcinogênicas, hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas (COPETTI, 2011).

Juntamente com o *A. flavus*, o fungo *A. parasiticus* é o mais importante representante de produção natural de aflatoxinas, ocorrendo especialmente na agricultura (COPETTI, 2011).

No estudo realizado por Copetti, 2011 demonstrou que todas as cepas isoladas de *A. parasiticus* foram capazes de produzir as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, diferentemente de *A. flavus* que produziu apenas as aflatoxinas B1 e B2.

Apesar de *A. flavus* e *A. parasiticus* serem muito semelhantes, existem algumas características que os distinguem como, a cor de suas colônias, onde *A. flavus* tem colônias verdes mais claras tendendo ao verde oliva, em contramão o *A. parasiticus* apresentam colônias verdes escuras.

Segundo estudo realizado por Yogendrarajah, 2015 *A. parasiticus* produz uma maior concentração de aflatoxinas do que *A. flavus* geralmente, mas ambos os fungos estão confinados nas regiões tropicais e subtropicais.

### 2.3.3. *Aspergillus nomius*

A espécie *A. nomius* é pertencente a seção flavi do gênero *Aspergillus*, faz parte de um grupo de 6 espécies economicamente importantes. Dentre elas, as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, são similares ao *A. nomius*, sendo a sua estrutura morfológica similar ao *A. flavus* e a produção de aflatoxinas análoga ao *A. parasiticus* (SILVA *et al*, 2015). Enquanto *A. flavus* produz normalmente apenas aflatoxinas do tipo B, *A. nomius* é capaz de produzir ambas as séries B (B1 e B2) e G (G1 e G2), semelhante a do *A. parasiticus* (EHRlich, 2004).

Inicialmente a espécie foi isolada do mofo de trigo nos EUA e vem sendo encontrado em solos asiáticos (SILVA *et al*, 2015). Estudos de amostras de solos da Tailândia demonstraram que *A. nomius* é mais amplo e comum do que se pensava; eles podem ser os produtores de aflatoxinas predominantes em determinados locais geográficos e deve ser considerado como um potencial agente etiológico de casos de contaminação por aflatoxinas, devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de aflatoxinas (EHRlich, 2007).

### 2.3.4. *Aspergillus ochraceus*

*A. ochraceus* é uma espécie do gênero *Aspergillus* conhecida por produzir a toxina ocratoxina A, uma das mais abundantes micotoxinas contaminantes de alimentos, e de citrinina (GHIBAUDO, 2010). Tradicionalmente um fungo do solo, já começou a adaptar-se a nichos ecológicos variados, como *commodities* agrícolas, viveiro de animais e espécies marinhas (WILSON, 2002; OSTRY, 2013; CUI, 2010). Nos seres humanos e outros animais, o consumo desse fungo produz sintomas neurotóxicos crônicos, imunossupressor, genotóxicos, carcinogênica e teratogênica (RAVELO ABREU, 2011). Seus esporos são uma das potenciais causas da asma em crianças e doenças de pulmão em seres humanos (REPONEN, 2012; NONNENMANN, 2010). As populações de suínos e de frango são os mais afetados por este fungo e suas micotoxinas (STOEV, 2010).

Este fungo também foi encontrado em uma ampla variedade de produtos agrícolas como milho, amendoim, semente de algodão, arroz, grãos de cereais, e frutos (WILSON, 2002). Do mesmo modo a presença deste fungo foi documentada em grãos de café (MOSLEM, 2010). Em termos de preferências climáticas, este fungo foi encontrado colonizando principalmente áreas geográficas temperadas e tropicais.

Os estudos toxicológicos mostraram que OTA tem fortes efeitos de micotoxinas cancerígenas no fígado e rins de seres humanos (LI, 2003). *A.ochraceus* pode ser associado com o desenvolvimento da asma em crianças (REPONEN, 2012). Os casos de perigos ambientais ocupacionais são documentados, devido à presença do fungo em pó orgânico da indústria avícola (NONNENMANN, 2010). Além de doenças pulmonares, também têm sido relatados casos de *A. ochraceus* causando sinusite paranasal.

#### 2.3.5. *Aspergillus melleus*

Este fungo também é produtor de toxinas, no caso ocratoxina A, assim como ocorre em *A. ochraceus*. *A. melleus*, era anteriormente considerado sendo como *A. ochraceus*, atualmente, devido aos avanços das técnicas moleculares, foi reclassificado como uma espécie diferente pertencente ao grupo de *A. ochraceus*. Nunca havia sido relatado como um patógeno em humanos, até o recente trabalho de Zotti, 2015. Neste trabalho *A. melleus* foi associado à infecção fúngica e a identificação foi realizada por técnicas moleculares.

#### 2.4. Estatinas

A partir de culturas do fungo *Penicillium citrinum* foi descoberto um potente inibidor da síntese do colesterol. Essa substância é utilizada por alguns microrganismos como defesa contra outros que necessitavam de esteróis e isoprenoides para o seu crescimento/metabolismo. Isso ocorre devido ao fato dessa

substância promover uma enorme disfunção metabólica acarretando assim, a morte do microorganismo (LINARELLI, 2008; ENDO, 2009).

Sequentemente, a partir de uma cepa de *P. citrinum* obteve-se um composto potencialmente inibidor da HMG-Coa redutase, denominado mevastatina. (ENDO, 2009). Em 1987 foi isolada de *Aspergillus terreus*, a lovastatina (CAMPO; CARVALHO, 2007; GINTER; SINKO, 2009).

A indústria farmacêutica realizou testes de forma a melhorar as moléculas das estatinas, e após a lovastatina, seguiu-se a fluvastatina, pravastatina e a sinvastatina (GINTER; SINKO, 2009). Em 1997, foram introduzidos os compostos sintéticos, a atorvastatina e a cerivastatina, sendo essa última já não existente mais no mercado por causar rabdomiólise (CAMPO; CARVALHO, 2007). A rosuvastatina foi introduzida no mercado em 2003, e indica ter melhor eficácia entre as estatinas (GINTER; SINKO, 2009).

## 2.5. Atividade antifúngica da sinvastatina

As estatinas atuam na biossíntese do ergosterol, essas drogas atuam numa etapa inicial da biossíntese dos esteróis. Elas inibem a HMG-CoA redutase, enzima que age em uma via em comum da síntese de colesterol em humanos e ergosterol em fungos. A sinvastatina é um tipo de estatina que é usada atualmente no tratamento de hipercolesterolemia, porém, também possui atividade antifúngica (MENEZES *et al.*, 2012; LIU, 2009).

Estudos recentes atribuem benefícios às estatinas, como atividade anti-inflamatória (JAIN; RIDKER, 2005), imunológica (BROADY; LEVINGS, 2008) e anti-carcinogênica (KARP, 2008; BJORKHEM-BERGMAN, 2010). As estatinas atuam por meio da inibição do sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase. Essa enzima catalisa a biossíntese do HMG-CoA em mevalonato, depois em farnesildifosfato (MACREADIE *et al.*, 2006). O difosfato de farnesil é o precursor para a produção de colesterol de seres humanos ou ergosterol em plantas e microrganismos eucarióticos (MACREADIE *et al.*, 2006).

A sinvastatina é produzida a partir de um produto de fermentação do *A. terreus*. O efeito inibitório das estatinas acontece em base na influência negativa

sobre a fluidez da membrana (NYILASI *et al.*, 2010; GYETVAI *et al.*, 2006). Elas afetam também indiretamente a sinalização celular (CORDLE *et al.*, 2005), a proliferação e diferenciação através da inibição da síntese de 15 terpenóides importantes (MIIDA *et al.*, 2004). Esses terpenóides são subprodutos do mevalonato e são reduzidos como consequência da diminuição nos níveis de geranylgeranilfosfatase e farnesilfosfatase, seus precursores (MEADOR; HUEY, 2010).

As estatinas também afetam na função mitocondrial dos fungos inibindo a produção de CoQ (coenzima Q; ubiquinona), heme A e proteínas prenitada. Já foi notificada atividade das estatinas *in vitro* contra fungos patogênicos, como espécies de *Candida* (QIAO *et al.*, 2007; WINKHE, 2007; LIU, 2009; MENEZES *et al.*, 2012), *C. neoformans*, Zygomycetos (LORENZ & PARKS, 1990, CHAMILOS, 2006) e *Aspergillus* spp (QIAO *et al.*, 2007).

## 2.6. Uso de nanopartículas de prata como antifúngico

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm recebido atenção especial devido ao seu potencial na utilização em aplicações biomédicas, tais como infecção, prevenção e cicatrização de feridas. A prata é utilizada a milhares de anos na história da humanidade. Dentre elas, jóias, moedas, ligas metálicas e explosivos. Além das propriedades culturais e estéticas, a prata possui uma atividade desinfetante e medicinal, sendo utilizadas pelos gregos antigos na conservação de água e vinho (CHEN, 2007).

Desde a segunda metade do século XX a prata já foi introduzida como creme de sulfadiazina de prata para tratar queimaduras, feridas e infecções (JAIN *et al.*, 2009). Tem sido comprovada uma forte atividade antibacteriana das nanopartículas de prata. No entanto, os efeitos da nanopartícula de prata contra fungos patogênicos não recebe a devida atenção nas pesquisas.

O tipo de nanopartícula, o método de preparo, o tamanho e formato das moléculas alteram a ação antimicrobiana das nanopartículas (HERMAN, 2014). O uso de AgNPs são vantajosas devido ao seu maior tamanho, em comparação aos íons de prata por exemplo. Esse maior tamanho, melhora a capacidade de reação

com variadas moléculas (LI, 2005). O tamanho, leva a uma elevada área de superfície, onde há uma grande quantidade de átomos disponíveis para reações. (MORONES, 2005).

As nanopartículas podem ser sintetizadas por muitos microorganismos, como *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, entre outros. A variação dos microorganismos pode modificar o tamanho, formato e também a ação das nanopartículas (HERMAN, 2014).

Panacek et al. (2006) descobriu que a nanopartícula de prata exibiu uma significativa atividade antifúngica contra estirpes clínicas isoladas de *Candida* spp. Kim et al. (2008) relatou que AgNPs mostrou potente atividade fungistática contra isolados clínicos e de estirpes ATCC de *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida* spp. Segundo estudo de Hernández - Sierra et al. (2008), determinou que a nanopartícula de prata possui atividade contra *Streptococcus mutans*.

As AgNPs estão provando ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos; no entanto, é necessário um grande esforço para compreender os efeitos contra outros patógenos fúngicos.

O mecanismo de ação da nanopartícula de prata ainda não foi totalmente reconhecido, entretanto, acredita-se que ela possui interação com estruturas da membrana plasmática, causando a dissipação de prótons e causando a morte celular (SONDI, SALOPEK-SONDI, 2004; LOK, 2006). Outro mecanismo é a atuação no fosfato das moléculas de DNA, causando prejuízos em sua duplicação e replicação. Além disso, ela age sobre proteínas que contém enxofre em sua estrutura, inibindo suas funções enzimáticas (GUPTA, 1998; MATSUMURA, 2003).

Sendo assim, o mecanismo de ação é a soma de vários mecanismos de ação. Os íons de prata possivelmente reagem com os grupos sulfidrilas das proteínas, podendo também interferir na cadeia transportadora de elétrons, também interferindo na permeabilidade da membrana de prótons e fosfatos (FENG, 2000).

## 2.7. Biofilmes como resistência a antifúngicos e alimentos

Os microrganismos patogênicos podem desenvolver vias alternativas para conferir resistência, que são as formações de biofilmes (CURY, 2010). Os biofilmes são uma comunidade de microrganismos associados e aderidos firmemente a uma superfície por meio de uma matriz extracelular de polímeros (HARDING *et al.*, 2009).

Comunidades celulares organizadas em biofilme são mais resistentes a drogas antifúngicas do que as células planctônicas. Os Institutos Nacionais da Saúde estimam que 80% das infecções humanas resultam de biofilmes patogênicos (HARRIOTT; NOVER, 2011). A utilização de antibióticos de largo espectro, neutropenia, nutrição parenteral, uso de cateteres, imunossupressão, perturbações de barreiras das mucosas devido à cirurgia, quimioterapia e radioterapia estão entre os mais importantes fatores de predisposição para estas infecções (RAMAGEL *et al.*, 2009).

Isso acontece também por que os biofilmes podem se formar em uma grande variedade de dispositivos médicos implantados (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Por isso, muita atenção é focada no desenvolvimento de novas formas de prevenir a formação de biofilme em superfícies médicas e também industriais (JIANG & PACE, 2006).

A maioria dos casos de infecção causada por biofilme tem como agente causador *Candida* spp, entre elas destaca-se a *Candida albicans*. Mas, os fungos filamentosos também podem causar infecção por formação de biofilme, entre eles, *Aspergillus* e *Trichosporon*, por exemplo (RAMAGE, 2012).

Os fungos filamentosos têm sido relatados formando biofilmes em diferentes habitats, como rochas, tanques de combustível, paredes de tubulações de água, silos na indústria alimentícia, entre outros. Fungos filamentosos, como *Aspergillus* sp. (Seção Nigri), *Aspergillus* sp. (Seção Flavi), *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp, tem sido amplamente visto formando biofilmes em diversos ambientes aquáticos, incluindo nos sistemas de distribuição de água potável (SIQUERIA; LIMA 2013).

Sendo assim, os biofilmes causados pelos microrganismos tem sido grande problema, pois beber água com biofilme além de mudar a coloração, odor e

degradar o sabor, causa também malefícios a saúde devido a compostos liberados pelos microrganismos como toxinas (RILEY *et al*, 2011). Fungos filamentosos também vêm causando um problema no ramo alimentício. Espécies de *Aspergillus* são responsáveis por provocar a deterioração de superfícies de substratos e de alimentos de importância industrial.

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular (PARIZZI *et al.* 2004).

Na indústria de alimentos os biofilmes podem se acumular em uma variedade de substratos como, por exemplo: aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fórmica, ferro, polietileno de baixa densidade, policarbonato, entre outros. Convém ressaltar que o biofilme, quando submetido ao calor, pode cristalizar e formar depósitos ou crostas que são muito aderentes, protegendo novos microrganismos e dificultando ainda mais os procedimentos de higiene (PARIZZI *et al.*, 2004).

Portanto, o controle da aderência de microrganismos às superfícies é essencial para manutenção da qualidade dos alimentos. As operações de lavagem e sanitização, mesmo que frequentes, não podem garantir a eliminação completa dos biofilmes, pois se sabe que muitas das superfícies em contato com o alimento assim como as tubulações e equipamentos, apresentam cantos, sulcos, rugosidades, rachaduras, e “zonas mortas” (de baixo fluxo) onde os biofilmes facilmente se desenvolvem (NITSCHKE, 2006). Sendo assim, é de suma importância processos eficazes na higienização de instrumentos nas indústrias alimentícias, promovendo assim, um maior tempo de uso dos equipamentos e proporcionando maior qualidade dos alimentos.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antifúngico de composto semi-sintético e biogênico contra cepas toxigênicas de *Aspergillus* spp.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antifúngico contra espécies do gênero *Aspergillus* da sinvastatina e nanopartículas de prata biogênicas;
- Verificar a concentração inibitória mínima da sinvastatina e nanopartícula de prata biogênica, assim como a interação das mesmas (Checkerboard);
- Verificar a concentração fungicida mínima da sinvastatina e nanopartícula de prata biogênica;
- Verificar a inibição da formação de biofilme;
- Verificar alterações morfológicas na célula fúngica na presença de sinvastatina, nanopartícula de prata biogênica e a interação dos dois compostos.

#### 4. REFERÊNCIAS

AMAIKE, S.; KELLER, N.P.; *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 107-133, 2011.

ARMSTRONG, A. W.; TAYLOR, C. R.; GOLAN, D.E. *et al.* Farmacologia das Infecções Fúngicas. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. p. 579-589, 2009.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**, v.81, p.167-206, 2002.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BJORKHEM-BERGMAN, L. *et al.* Lovastatin prevents carcinogenesis in a rat model for liver cancer. Effects of ubiquinone supplementation. **Anticancer Research**, v. 30, p. 1105–1112, 2010.

BRODY, R.; LEVINGS, M. K. Graft-versus-host disease: suppression by statins. **Nature Medicine**, v. 14, p. 1155–1156, 2008.

CAMPO, V.L; CARVALHO, J. Estatinas: hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 425-430, 2007.

CANUTO, M.M; RODERO, F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 550-563. 2002.

CHAMILOS, G, LEWIS, R.E.; KONTOYIANNIS, D.P. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, p. 96-103, 2006.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H.J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v.176, p. 1-12, 2007.

CORDLE, A. et al. Mechanism of statin-mediated inhibition of small G-protein function. Cleveland, Ohio: **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 34202–34209, 2005.

COPETTI, M.V. et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 02, p. 141-144, 2011.

COSTA, R. O.; CURSI, Í. B.; NEVES, M. L. P. F. Terapêutica em Micologia Médica. In: ZAITZ, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 393-403, 2010.

CUI, C.M. et al. 7-Nor-ergosterolide, a pentalactone-containing norsteroid and related steroids from the marine-derived endophytic *Aspergillus ochraceus* EN-31. **Journal of Natural Products**, v.73, n.11, p.1780–4, 2010.

CURY, A. E. Resistência a Antifúngicos Utilizados em Micologia médica. In: ZAITZ, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p. 393-403, 2010.

DESSELBERGER, V. Emerging and re-emerging infectious disease. **Journal Infectious Disease**, v. 40, p. 3-15. 2000.

Disponível em:

<<http://monographs.iarc.fr/eng/classification/classificationsalphaorder>>. Acesso em: 08 abr.2016.

Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc17db804f45fe2cbd41fdd785749fbd/Resolu%C3%A7%C3%A3o+0-2011-GGALI.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 33, n. 2, p. 1570-1571, 2009.

EHRlich, K. C. et al. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G

aflatoxin formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 6518-6524, 2004.

EHRlich, K. C. et al. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p. 153-159, 2007.

FENG, Q.L. *et al.* A mechanist study of the antibacterial effects of silver. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, n.4, p. 664-668, 2000.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Infectious diseases 2001: drug resistance, new drugs. **Drug Research**, v.5, p. 181-191. 2002.

.

GHIBAUDO, G.; PEANO, A. Chronic monolateral otomycosis in a dog caused by *Aspergillus ochraceus*. **Veterinary Dermatology**, v.21, n.5, p.522-526, 2010.

GINTER, E.; SIMKO, V. Statins: the drugs of the 21<sup>st</sup> century? **Bratislava Medical Journal**, v. 110, n.10, p. 6654-666, 2009.

GOUAS, D. ; SHI, H.; HAINAUT, P. The aflatoxin-induced *TP53* mutation at codon 249 (*R249S*): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. **Cancer Letters**, v. 286, p.29–37, 2009.

GUPTA, A.; MAYNES, M.; SILVER, S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escharichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p. 5042-5045, 1998.

GYETVAI, A. et al. Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans* but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n.8, p. 1140–1148, 2006.

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends in Microbiology**, v.19, n. 11, 2011.

HERMAN, A.; HERMAN, A.P. Nanoparticles as antimicrobial agents: Their toxicity and mechanisms of action. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n.1, p. 946-957, 2014.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J.F. *et al.* The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. **Nanomedicine**, v.4, n.3, p. 237-240, 2008.

JAIN, M. K.; RIDKER, P. M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. Boston, Massachusetts, U.S.A.: **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 977–987, 2005.

JIANG, X.; PACE, J.L. Microbial biofilms. In: Pace JL, Rupp ME, Finch RG (eds) **Biofilms infection and antimicrobial therapy**, Taylor and Francis Group, Boca Raton, p. 3-19, 2006.

KASNOWSKI, M.C. *et al.* Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.15, 2010.

KARP, I. *et al.* Statins and cancer risk. Elsevier, Nova York: **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 4, p. 302–309, 2008.

KIM, K.J. *et al.* Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 1482–1484, 2008.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E.K.; CHANDRASEKAR, P.H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**, v.52, n.3, p. 206–222, May, 2009.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. Houston:

**Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255–67, 2004.

LI, F.; JI, R. Ochratoxin A and human health. **Journal of Hygiene Research**, v. 32, n. 2, p. 172–5, 2003.

LI, P. *et al.* Synergistic antibacterial effects of  $\beta$ -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v.16, n.9, p. 1912-1917, 2005.

LINARELLI, M.C.B; POTTI JR, H. Statins: a review about vascular aspects. **Revista Ciências Médicas**, v. 17, n.1, p. 43-52, 2008.

LIU, G. *et al.* Simvastatin inhibits *Candida albicans* biofilm *in vitro*. **Pediatric Research**, v. 66, p. 600–604, 2009.

LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, *et al.* Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v.5, n.4, p.916-924, 2006.

LORENZ, R. T.; PARKS, L. W. Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 34, n.9, p. 1660–1665, 1990.

MACREADIE, I. G. *et al.* Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. **FEMS. Microbiology Letters**, v. 262, p. 9–13, 2006.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, n.7, p: 4278-4281, 2003.

MEADOR, B. M.; HUEY, K. A. Statin-associated myopathy and its exacerbation with exercise. **Muscle Nerve**, v.42, p.469-479, 2010.

MENEZES, E. A. *et al.* *In vitro* synergism of simvastatin and fluconazole against *Candida* species. São Paulo: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**

**Tropical**, p. 197-199, 2012.

MIIDA, T.; HIRAYAMA, S.; NAKAMURA, Y. Cholesterol independent effects of statins and new therapeutic strategies: ischemic stroke and dementia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.11, p. 253–264, 2004.

MISHRA, N. N. et al. Membrane fluidity and lipid composition of fluconazole resistant and susceptibles strains of *Candida albicans* isolated form diabetics patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 219-225, 2008.

MORONES, J.R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n.10, p. 2346-2353, 2005.

MOSLEM, MA. et al. Molecular detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from coffee beans in Saudi Arabia. **Genetics and molecular research**, v. 9, n.4, p. 2292–2299, 2010.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.*et al.* Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, p.51-65, 2006.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa.

EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

NONNENMANN, M.W. Culture-independent characterization of bacteria and fungi in a poultry bioaerosol using pyrosequencing: a new approach. **Journal of occupational and environmental hygiene**, v.7, n.12, p. 693 – 699, 2010.

NOSANCHUK, K. D. Current status and future of antifungal therapy for systemic mycoses. **Recent Patents Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, n.1, p. 75–84, 2006.

NYILASI, I. et al. *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307,

n.2, p. 175–184, 2010.

OSTRY, V.; MALIR, F.; RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins**, v.5, n.9, p. 1574-1586, 2013.

PANACEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.110, p.16248–16253, 2006.

PARIZZI, S. Q. F., et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**, vol.47, n.1, p.77-83, 2004.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A. *et al.* Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Bulletin of the World Health Organization**, v.77, n.9, p.754-766, 1999.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p. 184-192, 2000.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M. *et al.* Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Food Science and technology**, v. 20, p.192-196, 2000.

QIAO, J. et al. Antifungal activity of statins against *Aspegillus* species. **Medical Mycology**, v. 45, p. 589-593, 2007.

RAMAGEL, G. et al. Our current understanding of the basic biology and clinical implications associated with fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 340–355, 2009.



RAMAGE, G. et al. Fungal Biofilm Resistance. **Internacional Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

RAVELO- ABREU, A. et al. La ocratoxina A en alimentos de consume humano: revision. **Nutricion hospitalaria**, v.26, n.6, p. 1215–26, 2011.

REPONEN, T. et al .Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.130, n.3, p 639–644, 2012.;

RILEY, M.R.; GERBA, C.P.; ELIMELECH, M. Biological approaches for addressing the grand challenge of providing access to clean drinking water. **Journal of Biological Engineering**, v.5, n. 2, 2011.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J. et al. Phylogeny, identification, and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v.78, p. 141-173, 2014.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminants**, v.25, n.2, p.146–151, 2008.

SILVA, F.C. et al Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: uma revisão. **Revista Ifes Ciência**, v.1, n.1, 2015.

SIQUEIRA, V.M.; LIMA, N. Biofilm Formation by filamentous fungi recovered from a Water system. **Journal of Mycology**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.275, n.1, p.177-182, 2004.

STOEV, S.D. et al. Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan endemic nephropathy. **Food additives & Contaminants**, v.27, p. 72-88, 2010.

WIKHE, T.; WESTERMEYER, C.; MACREADIE, I. G. Biological consequences of statins in *Candida* species and possible implications for human health. Australia: **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1529-1532, 2007.

WILSON, D.M.; MUBATANHEMA, W.; JURJEVIC, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. **Advances In Experimental Medicine and Biology**, v.504, p. 3–17, 2002.

ZAITS, C. **Compêndio de micologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ZOTTI, M. *et al.* Onychomycosis from *Aspergillus melleus*, a novel pathogen for humans. **Experimental Dermatology**, v. 24, p. 966-982, 2015.

YOGENDRARAJAH, P. *et al.* Toxigenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method. **Food Microbiology**, v.52, p. 185-196, 2015.

YU, J.; Payne, P.A.; NIERMAN, W.C.; MACHIDA, M.; BENNETT, J.W. *et al.* *Aspergillus flavus* genomics as a tool for studying the mechanism of aflatoxin formation. **Food Additives & Contaminants**, v.1, p. 1–6, 2008.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ARTIGO

Os resultados e discussão, assim como a metodologia utilizada para o referente trabalho, encontram-se em forma de artigo, seguindo as normas da revista Food Control.

Atividade antifúngica de nanopartículas de prata biogênicas e sinvastatina contra cepas toxigênicas de *Aspergillus* sp.

Karla Paiva Bocate<sup>1</sup>, Luciano Aparecido Panagio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

Autor Correspondente\*: Luciano Aparecido Panagio, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP: 86055-900, Londrina, PR, Brasil, Telefone: +55 (43) 3371-4976, e-mail: lapanagio@gmail.com

## RESUMO

*Aspergillus* spp são fungos ubíquos e causam grandes danos na saúde dos seres humanos e outros animais e no ramo alimentício, pois atacam grãos como cereais, milho, café, entre outros. Podendo produzir toxinas que permanecem no alimento mesmo após o processamento. Dentre as micotoxinas, as que apresentam maior potencial de dano são aflatoxinas e ocratoxinas. Neste estudo, avaliou-se a atividade antifúngica da sinvastatina e de nanopartículas de prata biogênicas, avaliando os efeitos dos compostos isoladamente e sua combinação. Foram utilizados os métodos disco difusão, poço difusão, CIM (Concentração inibitória mínima), interação dos compostos (checkerboard) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a sinvastatina isolada foi encontrada CIM50 de 78 µg/mL para *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* e de 39 µg/mL para *A. ochraceus* e *A. melleus*. Quanto a nanopartícula de prata para *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* a CIM50 foi de 8 µg/mL e para *A. melleus* e *A. ochraceus* 4 µg/mL. Verificamos os efeitos dos compostos quanto a inibição e a formação do biofilme e visualizamos em MEV, a ação dos tratamentos em relação a inibição da germinação de esporos e as estratégias realizadas pelos isolados com os compostos tratados. Em nosso estudo, observamos um grande potencial antifúngico desses compostos, quando utilizados isoladamente e/ou em interação, tendo efeitos sinérgicos e aditivos contra as cepas toxigênicas. Juntos, os dados nos permitem sugerir que os compostos apresentam potencial emprego na armazenagem (em silos ou embalagens) e cadeia de processamento de alimentos, como em etapas de desinfecção.

**Palavras-chave:** micotoxinas; sinvastatina, nanopartícula de prata, *Aspergillus*.

## 1. Introdução

Os fungos filamentosos são capazes de crescer em diversos substratos e possuem elevada capacidade de formar metabólitos, do grande interesse biotecnológico (MAPARI, 2008). Estes organismos apresentam importante participação na produção de alimentos, em produtos para saúde e na reciclagem de compostos na biosfera (HAJJAJ, 2000). Em contrapartida, a detecção das doenças causadas por fungos estão aumentando (MISHRA, 2008), existindo também maiores detecções de toxinas por gêneros de fungos filamentosos (BENNETT, 2003).

As micotoxinas são metabolitos secundários, produzidas principalmente por uma variedade de cepas toxigênicas de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, (TERZI *et al.*, 2014). As condições de pré e pós- colheitas podem ser pontos de contaminação (ROCHA *et al.*, 2014). As micotoxinas já foram detectadas em vários commodities em todo o mundo (NJOBEL *et al.*, 2010). Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas (AFs) são consideradas as toxinas mais importantes, contaminando os alimentos (STROSNIDER *et al.*, 2006; YEHA, 2014).

Segundo IARC (International Agency for Research on Cancer) 2010, as micotoxinas podem ser classificadas perante ao risco de causar câncer em humanos e outros animais. As aflatoxinas são classificadas como carcinógenos de grupo 1, ou seja, estas micotoxinas são evidenciadas como causadoras de câncer em humanos e outros animais. As AFs atraem atenção mundial por causa do seu impacto significativo na saúde, nos alimentos, agricultura e comércio. Existem quatro principais aflatoxinas, as aFs B1, B2, G1 e G2, sendo a AFB1 a mais importante quanto a toxicidade e ocorrência, com potencial altamente carcinogênico (MAKUN *et al.*, 2012). As AFs são produzidas predominantemente pelo gênero *Aspergillus*, e em especial por duas espécies, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As principais commodities agrícolas suscetíveis à contaminação por AFs incluem amendoim, milho, sementes de algodão, sorgo, grãos de cacau, especiarias, arroz, frutas e legumes (MAKUN *et al.*, 2012).

Uma outra micotoxina de grande importância é a ocratoxina, em especial a ocratoxina A (OTA), que pode ser produzida por certas espécies de *Aspergillus*, como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus melleus* e também algumas espécies de *Penicillium* (HEUSSNER, 2015). As ocratoxinas são classificadas como 2B, ou seja, as toxinas são possíveis causadores de câncer em

humanos e outros animais. Além destas classificações citadas, a IARC classifica as toxinas fúngicas em grupos 2A (prováveis causadores de câncer), 3 (não classificado quanto a sua carcinogenicidade para humanos e 4 (provavelmente não carcinogênico).

É crescente a detecção de contaminação alimentar por OTA, e é frequentemente detectada em todos os tipos de cereais e produtos de cereais, café, cacau, uvas, uvas passas, vinho, soja, nozes leguminosas e cerveja (STREIT, 2012; BELLVER, 2014; HAIGNTON, 2012). No Brasil, por ser um grande produtor de cereais e café, a contaminação por OTA prevalece nesses produtos.

Devido ao grande impacto das micotoxinas na saúde, há a grande necessidade de atenuar ou até mesmo inibir a sua presença em produtos alimentares (PIZZOLITTO *et al.*, 2011). Segundo a resolução da ANVISA RDC No. 7 de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos trás que os níveis para aflatoxinas variam de 1 a 20 µg/kg dependendo do tipo de alimentos, como exemplo de 1 µg/kg temos alimentos à base de cereais para alimentação infantil de de 20 µg/kg Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto. Para as ocratoxinas os níveis variam de 2 a 30 µg/kg, sendo o de 2 µg/kg como exemplo, o suco de uva e o de 30 µg/kg as especiarias, como pimentas.

Entretanto, a falta de antifúngicos no mercado é normalmente observada e também os organismos promovem resistência (NYILASI, 2010; CURY, 2010). Sendo assim, a busca por novos compostos, naturais ou semi-sintéticos com potencial antifúngico tem aumentado.

A sinvastatina é um composto semi-sintético, isolado inicialmente do fungo *A. terreus*, tem atuação na síntese de colesterol e frequentemente utilizada em ações médicas. Contudo, este composto demonstra-se capaz de inibir o crescimento de microrganismos, demonstrando-se altamente eficaz como antifúngico (QIAO, 2007). A sinvastatina demonstrou atividade antimicrobiana em bactérias Gram positivas e Gram negativas (THANGAMANI, *et al* 2015). Entretanto, a ação deste composto ainda não é muito conhecida contra fungos filamentosos, especialmente fitopatógenos, sendo escasso na literatura trabalhos referente à sua ação.

A nanopartícula de prata (AgNP) é um composto sintetizado pelo *Fusarium oxysporum*, ma concentração de  $10^{-3}$  Molar de AgNO<sub>3</sub> é acrescido a 10 gramas de micélio fúngico em 100 ml de água destilada esterilizada. Após um

período de 15 dias, as AgNP's formadas pelo fungo possuem uma concentração aproximada de 1g/L (DURAN, 2005). Este composto, ainda não é usual no mercado, porém estudos comprovam a sua elevada ação antimicrobiana (PANACEK *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008, HERNÁNDEZ-SIERRA *et al.*, 2008). Fernandez *et al* 2010 utilizaram sachês de celulose com adição de AgNP para a armazenagem de carnes e obtiveram redução de 1 log(10) UFC/g de crescimento bacteriano, mostrando assim efetividade na redução da atividade antimicrobiana. Fernandez *et al* 2010, também armazenaram cortes de melão em filmes de celulose contendo AgNP e obtiveram redução de 3 log(10) UFC/g se comparado ao filmes sem AgNP. Outro fator importante na utilização de embalagens contendo AgNP é a redução da produção de gás etileno em frutas, estendendo assim o tempo de maturação de frutos climatéricos, promovendo o prolongamento de seu prazo de validade (ALMEIDA, 2015).

O objetivo desta pesquisa foi a utilização de AgNP biogênicas e sinvastatina que possuem elevada capacidade antifúngica contra as cepas toxigênicas de *Aspergillus*, testadas isoladas e conjugadas, visando aplicabilidades comerciais para os compostos.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Microorganismos utilizados, cultivo e armazenamento

Os microrganismos utilizados neste estudo foram cepas toxigênicas dos fungos filamentosos: *Aspergillus flavus* CMT 00335, *Aspergillus nomius* CMT 00328, *Aspergillus parasiticus* CMT 00336, produtores de aflatoxinas. *Aspergillus melleus* CMT 00144 e *Aspergillus ochraceus* CMT 00435, produtores de ocratoxinas, cedidas gentilmente pela Fiocruz – Manguinhos, Rio de Janeiro. As cepas foram cultivadas em tubos contendo Ágar Sabouraud dextrose (HIMEDIA<sup>®</sup>, Mumbai, India) ou Ágar Batata dextrose (HIMEDIA<sup>®</sup>), ficando incubadas por sete dias a 30 °C na BOD. Após o cultivo, todas as cepas foram armazenadas em glicerol 40% e estocadas a -20 °C.

### 2.2. Agentes antifúngicos

#### 2.2.1 Sinvastatina

A sinvastatina obtida comercialmente (Henan Topfond Pharmaceutical Co. Ltda., Yicheng, Zhumadian, Henan, China) A droga, disponível sob a forma de pró-fármaco, foi ativada por hidrólise em NaOH a 0,25 M a 37 °C durante uma hora. O pH foi ajustado para 7.4 com HCl 0,25 M e depois armazenada a -20 °C na concentração de 5000 µg/mL (adaptado de LORENZ & PARKS, 1990).

#### 2.2.2 Nanopartícula de Prata (AgNP)

A nanopartícula de prata foi obtida biologicamente como descrita anteriormente (DURÁN, 2005). O fungo *Fusarium oxysporum* foi cultivado em Ágar Malte (DIFCO<sup>®</sup>, Sparks, USA) contendo 5% de extrato de levedura, durante sete dias a 30°C. Em seguida, a biomassa fúngica foi retirada da placa com auxílio de uma alça microbiológica esterilizada. Cada 10 gramas de biomassa fúngica foi adicionada a 100 mL de água destilada esterilizada. Em seguida a suspensão foi



incubada com agitação (150 rpm), durante 72 h a 30°C ao sobrenadante. Após essa etapa, a biomassa foi filtrada à vácuo (papel de filtro Qualy 9,0 cm de diâmetro, 80 m<sup>-2</sup> gramatura, 205 µm espessura, 14 µm na maioria dos poros) e nitrato de prata (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, USA) foi adicionado ao sobrenadante, para uma concentração final de 10<sup>-3</sup>M. A suspensão foi mantida no escuro durante por 14 dias a 30°C, para formação das AgNP.

### 2.2.3 *Caracterização das nanopartículas de prata biológicas*

Periodicamente, alíquotas da suspensão foram retiradas e a absorbância medida em espectrofotômetro UV-Vis em 440 nm. As nanopartículas biológicas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. O tamanho médio das nanopartículas foi de 90 nm. O potencial zeta foi medido no equipamento Potencial Zeta Matec/Zeta APS, Campinas, BR (Figura 1).

### 2.3 *Determinação de micotoxinas*

A detecção de micotoxinas foi feita em meio Ágar Leite de Coco, como método descrito por Davis (1987) com modificações. Foi utilizado leite de coco adquirido comercialmente, o qual foi adicionado em proporção 1:1 (150 mL de leite de coco, 150 mL de água destilada/ ágar 2%). Discos miceliais de 6 mm de diâmetro de cultura de 7 dias em Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA<sup>®</sup>) foram transferidos para o centro de placas contendo o ágar leite de coco. Após incubação de 72 h à 30 °C, as placas foram fotografadas em câmara sob luz UV. A emissão de fluorescência, observada na margem das colônias, foi considerada uma confirmação da produção de micotoxinas.

### 2.4 *Teste de difusão em ágar*

Os testes de difusão em ágar foram realizados de acordo com o documento M51-A2 do *Clinical laboratory Standards Institute* (CLSI - 2010), com adaptações. As cepas foram inicialmente cultivadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA<sup>®</sup>) e incubadas a 30 °C por sete dias. A suspensão fúngica foi preparada com em solução tampão fosfato-salino (PBS) esterilizado. O inóculo foi

ajustado para  $10^5$  de esporos/mL após contagem em câmara hematocitométrica (câmara de Neubauer). Foram distribuídos uniformemente 100  $\mu$ L ( $10^4$  esporos) da suspensão em placas contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA®).

Discos de papel de 6 mm de diâmetro (LABORCLIN, Vargem Grande, Pinhais, Brasil) foram impregnados com 10  $\mu$ L de solução de sinvastatina em concentrações variáveis (entre 50 – 6,25  $\mu$ g/mL). Após secagem os discos foram colocados sobre a superfície das placas de cultura (preparadas conforme descrito anteriormente), que foram então incubadas a 30 °C. Após 48 h de incubação foram medidos os halos de inibição.

## 2.5 *Teste de poço difusão*

A técnica do poço difusão segue a mesma metodologia descrita no item 2.4, com alterações. Em placas de Ágar Sabouraud dextrose, inoculou-se  $10^4$  de esporos de cada amostra de fungo. Foram escavados poços de 6 mm de diâmetro, para onde foram transferidos 50  $\mu$ L de suspensões de sinvastatina, em concentrações que variaram entre 250-0,04  $\mu$ g/mL, seguindo-se um fator de diluição de razão dois. As placas foram incubadas a 30 °C e após 48 horas de incubação foram medidos os halos de inibição.

## 2.6 *Teste de suscetibilidade antimicrobiana*

### 2.6.1 *Concentração inibitória mínima (CIM)*

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em triplicata por teste de microdiluição em caldo em placa de 96 poços, de acordo com o documento M38-A2 do CLSI (2008), com adaptações. Foram adicionadas diferentes concentrações de sinvastatina (1250 $\mu$ g/mL a 2,44  $\mu$ g/mL) e AgNP (135  $\mu$ g/mL a 0,26  $\mu$ g/mL). As cepas foram inicialmente cultivadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 30 °C por sete dias. A suspensão fúngica foi preparada com em solução tampão fosfato-salino (PBS) esterilizado. Após contagem em câmara hematocitométrica, o inóculo foi ajustado para  $10^4$  de esporos/mL em meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato - Sigma Aldrich®) acrescido

de tampão MOPS (INLAB, São Paulo, BR), pH 7,2 a 7,4. Alíquotas de 100 µL da suspensão fúngica foram adicionadas a cada poço. A placa foi incubada por 48h a 30 °C e realizada leitura visual.

### 2.6.2 Interação entre os compostos (Checkerboard)

Após determinar a CIM, analisamos o efeito em combinação dos compostos (Sinvastatina e AgNP) sobre o crescimento fúngico. Em microplacas de 96 poços, seriou-se no sentido horizontal a sinvastatina com concentrações variando de 625 – 0,305 µg/mL e no vertical a AgNP com concentrações variando de 135 - 1 µg/mL, diluídas em RPMI 1640. As cepas foram inicialmente cultivadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 30 °C por sete dias. A suspensão fúngica foi preparada com a ressuspensão em solução tampão fosfato-salino (PBS) estéril com concentração de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, e pH de 7,4. Posteriormente, a concentração dos esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. As suspensões fúngicas contendo 10<sup>4</sup> esporos foram então diluídas em RPMI 1640 (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato) acrescido de tampão de MOPS (pH 7,2 a 7,4). Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em toda a placa, com exceção do controle negativo. A placa foi incubada por 48h a 30 °C e realizada leitura visual.

Para categorizar a interação foi encontrada a concentração inibitória fracionária (CIF) que foi calculada segundo Chin (1997) de acordo com a equação:

$$CIF = \frac{CIM(SIN\ interação)}{CIM(SIN\ isolado)} + \frac{CIM(AgNP\ interação)}{CIM(AgNP\ isolado)}$$

Se o resultado for CIF < 0,5 significa que há SINERGISMO; se for entre 0,5 e 1,0 significa ADITISMO; se for entre 1,0 e 2,0 significa SEM INTERAÇÃO e se for maior que 4 significa ANTAGONISMO.

## 2.7 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A atividade fungicida *in vitro* foi determinada para cada droga isolada, segundo protocolo descrito por Espinel-Ingroff (2002). Em resumo, retirou-se 20 µL de cada poço onde observou-se visualmente inibição completa do crescimento fúngico, os quais foram cultivados em placas de Ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 h. A CFM é a concentração mais baixa do composto que demonstrou como resultado ausência de crescimento fúngico ou formação menor do que três colônias.

## 2.8. Efeito do uso de AgNP e sinvastatina isoladas ou em conjugação na fase de formação de biofilme

Neste experimento foi avaliado o efeito das drogas na formação do biofilme, de acordo com o protocolo de Jin *et al.* (2003), com adaptações. Os fungos filamentosos foram cultivados em Ágar Sabouraud Dextrose e incubados a 30 °C por sete dias. Após contagem em câmara de Neubauer foi preparada uma suspensão contendo  $10^4$  esporos/mL. Foram preparados concentrações dos compostos baseados na CIM, variando de 9,75-625 µg/mL para sinvastatina e 1-8µg/mL para AgNP. Alíquotas de 100 µL dos compostos isolados ou em interação e 100 µL da suspensão celular (contendo  $10^4$  esporos) foram distribuídas em placa de 96 poços de fundo chato, que foi incubada a 30 °C por 24 h.

Após as 24 h, o conteúdo dos poços foi aspirado com auxílio de uma micropipeta multicanal e os poços lavados uma vez com PBS para remoção das células não aderidas. Após ter ocorrido adesão celular à placa, as drogas foram adicionadas juntamente com o meio, nas concentrações citadas anteriormente. A placa foi incubada por 72 h a 30 °C. Após as 72 h de incubação, removeu-se todo o conteúdo dos poços, e lavou-se duas vezes com PBS e deixou a placa secando a temperatura ambiente por 45 min. Após essa etapa, o biofilme foi corado adicionando em cada poço 110 µL de cristal violeta 0,4%. Por último, o biofilme foi lavado quatro vezes com 300 µL/poço de água ultrapura estéril e descorada com 200 µL/poço de etanol 95% por 45 min. Então, 100 µL da solução descorante foram transferidas para uma nova placa de 96 poços. Realizou-se a leitura no leitor microplacas à 470 nm (Bio Stack Ready). Subtraiu-se o valor obtido para o controle

negativo de cada amostra para normalização dos resultados.

## 2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura, suspensões de *A. flavus* e *A. ochraceus* ( $10^4$  esporos) com e sem os compostos antifúngicos (valores encontrados na CIM) foram colocados em lamínulas estéreis, em uma placa de 24 poços e incubadas por 24 horas. Após a incubação, tirou-se o meio de cultura, e cada lamínula foi fixada com glutaraldeído 3% (Sigma- Aldrich<sup>®</sup>), paraformaldeído 2% (Sigma- Aldrich<sup>®</sup>) em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M a pH 7,2 (Sigma- Aldrich<sup>®</sup>) por 16-18 horas. Após esse período, todas as lamínulas foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M a pH 7,2 (Sigma- Aldrich<sup>®</sup>) por 10 minutos, repetindo três vezes. Retirou-se o tampão e as amostras foram desidratadas gradualmente em álcool (70, 80, 90, 100 °GL) por 10 minutos, três vezes em cada concentração. Em seguida, as lamínulas foram levadas ao ponto crítico em CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), montadas em “stubs” e revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater). Finalmente, as lamínulas foram analisadas sob Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200.

## 2.10 Análises estatísticas

Foi realizado teste desvio padrão para as metodologias de disco difusão e poço difusão. Para a metodologia de inibição da formação de biofilme, todos os testes foram feitos em triplicata e os resultados foram avaliados pelo ANOVA e Tukey, considerando  $p < 0.05$  estatisticamente significativo, através do programa GraphPad Prism 5.

### 3. Resultados e discussões

#### 3.1. Determinação de micotoxinas

A metodologia empregada proporciona resultados qualitativos, úteis para o screening de cepas de fungos produtores de toxinas e para confirmação da produção destes metabólitos por cepas de referência (VIEGAS, 2014). Microrganismos podem perder de deixar de exibir determinadas características ou produção de alguns metabólitos secundários após repiques sucessivos. Esta metodologia é baseada na cultura das cepas em Ágar leite de coco, rico em lipídios, o que favorece a produção de micotoxinas. Conforme demonstrada na figura 1, houve produção de toxinas pelos fungos, evidenciada pela fluorescência (emitida após exposição à luz UV) ao redor da zona de crescimento da colônia. Verifica-se produção de aflatoxina (Fig. 2 A, B e C) e ocratoxina (Fig. 2 D e E) por cepas toxigênicas de *Aspergillus*. Estes resultados asseguram que as cepas mantiveram suas características originais mesmo após repiques sucessivos.

#### 3.2. Difusão em ágar e poço difusão

Como observado nas tabelas 1 e 2, as concentrações de sinvastatina testadas em todos os organismos foram capazes de formar halos de inibição após 48 h de incubação. Na metodologia de disco difusão, foi possível observar formação de halo de inibição nas concentrações de 50–12,5 µg/disco para as cepas de *A. melleus* e *A. ochraceus*, respectivamente. Nas cepas de *A. nomius* e *A. parasiticus* houve formação de halo de inibição nas concentrações de 50–25 µg/disco, respectivamente. *A. flavus* apresentou a maior sensibilidade à sinvastatina neste método: concentração de 12,5 – 6,25 µg/disco foram suficientes para produzir inibição, visualizada pela produção de halo. Comparativamente, observamos halos de inibição em concentrações de 4-30 vezes menores que encontradas por Qiao et al (2007), que demonstraram em teste de disco difusão que somente concentrações maiores ou iguais à 200 µg/disco foram capazes de produzir halo de inibição para cepas do gênero *Aspergillus*.

Na metodologia de poço difusão foi possível observar inibição do crescimento de *A. flavus* na concentração de 3,9 µg/poço e de 15,6 µg/mL para *A.*

*parasiticus*, *A. nomius*, *A. melleus* e *A. ochraceus*. Nesta metodologia a cepa de *A. flavus* produtora da aflatoxina B1 também se mostrou mais susceptível a ação da sinvastatina..

### 3.3. Concentração inibitória mínima da sinvastatina e nanopartículas de prata/ interação dos compostos (checkerboard)

Na metodologia de microdiluição em caldo todas as cepas utilizadas demonstraram sensibilidade à sinvastatina e AgNP, conforme demonstrado na tabela 3. A CIM para sinvastatina foi de 78µg/mL para *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* e 19,5 µg/mL para *A. ochraceus* e *A. melleus*. A CIM das AgNPs foi de 8 µg/mL para *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* e 4 µg/mL para *A. ochraceus* e *A. melleus*.

Os resultados da CIM para AgNP revelaram uma alta susceptibilidade das cepas toxigênicas do gênero *Aspergillus* frente a este composto. Mousavi e Pourtalebi (2015) encontraram valores muito mais elevados de CIM para AgNP contra *A. parasiticus*: 180 µg/mL, um valor muito mais elevado do que encontrado neste presente estudo. Kim et al (2008) obtiveram CIM de 1-7 µg/mL para AgNP contra espécies de *Candida* e *Trichophyton mentagrophythes*. Em nosso estudo os valores ficaram entre 4-8 µg/mL para fungos do gênero *Aspergillus*. Este dado nos permite intuir que a AgNP utilizadas em nosso estudo apresentam efetividade antifúngica elevada.

A associação sinérgica de dois compostos o efeito resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles, o que pode levar a aumento da eficácia, redução da toxicidade, diminuição dos efeitos adversos, menor dose terapêutica e redução do avanço da resistência microbiana aos antimicrobianos. Já no aditismo o efeito combinado dos fármacos é igual à soma aritmética dos efeitos dos fármacos individuais, nas doses escolhidas. (VAN VUUREN, 2011)

Quando utilizado a metodologia de interação entre os compostos, ou checkerboard (tabela 3), observamos efeito antifúngico sinérgico ou aditivo, dependendo das cepas fúngicas. Para *A. flavus* e *A. parasiticus* houve sinergismo e, para *A. melleus*, *A. nomius* e *A. ochraceus*, observamos aditismo entre os compostos testados.

### 3.4. Concentração fungicida mínima (CFM)

A metodologia da concentração fungicida mínima dos compostos foi comparada à CIM previamente obtida. Obtivemos (tabela 4) para as cepas de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* CFM de sinvastatina de 312 µg/mL. Comparativamente à CIM (78 µg/mL), verificamos que para efeito fungicida para as três cepas são requeridas quantidades quatro vezes maiores de sinvastatina. Para *A. melleus* e *A. ochraceus* obtivemos uma CFM de 78 µg/mL de sinvastatina, um valor também quatro vezes maior que a encontrada na CIM. Quanto a AgNP, a CFM foi oito vezes maior que a CIM para *A. flavus*. Para os fungos *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. melleus* e *A. ochraceus* foram requeridas concentrações quatro vezes maiores para alcançar a CFM.

### 3.5. Efeito na fase de formação do biofilme em fungos do gênero *Aspergillus*

A sinvastatina inibiu a formação de biofilme de *A. flavus* nas concentrações de 4-8x CIM e diminuiu significativamente nas concentrações de 2x CIM. As AgNP inibiram completamente a formação do biofilme e a combinação dos dois compostos (SIN + AgNP) nas concentrações de 2- 8xCIM foram capazes de inibir a formação do biofilme (Figura 3A).

Em relação à ação da sinvastatina contra o biofilme de *A. melleus*, verificamos que a droga inibiu a formação do biofilme na concentração de 4xCIM e diminuiu significativamente nas concentrações de CIM, 2x e 8xCIM. Quanto a AgNP, as concentrações de 2x-8x CIM foram capazes de inibir a formação do biofilme, e a concentração igual ao CIM diminuiu a formação do biofilme. Na interação dos compostos, as concentrações 2x- e 8xCIM, diminuíram significativamente a formação do biofilme (Figura 3B).

Quando sinvastatina e AgNP foram utilizadas em conjunto contra *A. nomius* houve redução significativa da formação do biofilme, onde a concentração de 8x CIM da interação dos compostos foi capaz de inibir a formação do biofilme (Figura 3C). Com relação a *A. ochraceus* (Figura 3D), podemos afirmar que todas as concentrações utilizadas foram capazes de diminuir significativamente a formação do biofilme, e algumas concentrações (2xCIM SIN; 2x CIM AgNP) inibiram a



formação do biofilme.

Todas as concentrações testadas foram potencialmente e inibidoras da formação do biofilme de *A. parasiticus* (Figura 3E). Os resultados obtidos demonstram que tanto isoladamente como em conjunto os compostos apresentam inibição da formação do biofilme.

### 3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. flavus* e *A. ochraceus*

Pudemos observar que sinvastatina e AgNP causaram danos severos nas hifas de *A. flavus* e *A. ochraceus* (figura 4 e 5). Na concentração de 78 µg/mL de sinvastatina para *A. flavus* observamos a não formação de hifas, comparativamente ao controle, e também uma redução significativa na germinação de esporos (Fig 4C). Além disso, os poucos esporos que germinaram formaram hifas deformadas, de tamanho reduzido e com múltiplas ramificações laterais. Em contrapartida, quando exposta a AgNP em uma concentração de 8 µg/mL (Fig 4E), observamos menor germinação de esporos e ramificação menos pronunciada. Análises pormenorizadas em aumento de 12.000x demonstraram uma deposição das AgNPs no esporo (Fig 4F), assim como produção de rugosidade no esporo/hifa. Neste tratamento não foi possível observar a liberação da matriz extracelular. Quando o tratamento foi combinado (19,5 µg/mL de sinvastatina + 2 µg/mL de AgNP), observamos ausência da germinação de esporos. Verificamos após observação de fotomicrografia (Fig 4H) os efeitos da combinação: deposição de prata, rugosidade estrutural e perda de matriz extracelular.

Comparativamente, a AgNP demonstra um maior efeito do que a sinvastatina, pois apresenta maior inibição na germinação dos esporos. Entretanto, quando os compostos são combinados, observa-se que o efeito da AgNP é otimizada. Este processo deve ocorrer porque a sinvastatina age sobre a enzima HMG CoA Redutase, que atua na formação do ergosterol, desestruturando a membrana (MENEZES *et al.*, 2012; LIU, 2009). As AgNP, por sua vez, apresentam outros mecanismos de ação: ligação em grupos fosfato presentes no DNA comprometendo replicação e duplicação (GUPTA, 1998; MATSUMURA, 2003), interagindo com estruturas da membrana plasmática, causando a dissipação de

prótons e causando a morte celular (SONDI, SALOPEK-SONDI, 2004; LOK, 2006). Outro possível mecanismo seria de que os íons de prata possivelmente reagem com os grupos sulfidrilas das proteínas, podendo também interferir na cadeia transportadora de elétrons, também interferindo na permeabilidade da membrana de prótons e fosfatos (FENG, 2000).

Quando analisamos a atividade de 19 µg/mL de sinvastatina sobre *A. ochraceus*, verificamos uma acentuada diminuição da quantidade de hifas. Observou-se também diminuição e alteração da germinação dos esporos, que apresentaram ramificações multi-laterais e hifas de tamanhos muito reduzidos. (Fig. 5C). Em maior aumento (Fig. 5D) observamos germinação com deformação e produção de matriz celular, com hifas pouco alongadas. Tanto a hifa como o esporo apresentaram elevada rugosidade, comparativamente ao grupo controle. O tratamento com AgNP à 4 µg/mL propiciou uma diminuição ainda mais significativa na germinação dos esporos, quando se refere ao tratamento com sinvastatina (Fig. 5E). Ainda que houvesse esporos nas fotomicrografias analisadas, a germinação foi mais comprometida. AgNP produziu esporos com deformações e hifas parcamente desenvolvidas, deformadas e com deposições superficiais de nanopartículas. De forma geral, concluímos que AgNP apresentam melhor efeito na inibição da germinação do que sinvastatina. Quando o tratamento foi combinado (9,75 µg/mL de sinvastatina + 1 µg/mL de AgNP) houve diminuição da germinação de esporos, a qual foi menor que aquela encontrada no tratamento com AgNP isoladamente. Esse fato pode ser explicado pela pequena quantidade de prata na combinação, que é aditiva, não sinérgica (ao contrário do observado em *A. flavus*, quando há sinergismo). Observamos ainda (Fig 5H) que os compostos causaram deformações nos esporos e perda de matriz extracelular.

#### **4. Conflitos de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

#### **5. Agradecimentos**

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq , Brasil) E pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ( CAPES , Brasil), por ter concedido a bolsa de mestrado.

## Referências

- Almeida, A. C. S., Franco, E. A. N., Peixoto, F. M., & Pessanha, K. L. F., Melo, N. R. (2015). Application of nanotechnology in food packaging. *Polímeros*, 25, 89-97.
- Bellver Soto, J., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M. J., & Juan-García, A. (2014) Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern European countries: Wine and beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 62, 7643–7651.
- Bennett, J. W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516.
- Chin, N., Weitzman, I., & Della-Latta, P. (1997). In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with flucanazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 850-852.
- Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada: Norma Aprovada M38-A2*. Wayne, PA, USA, 2008.
- Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing Of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline M51-A2*. Wayne, PA, USA, 2010.
- Cury, A. E. (2010). Resistência a antifúngicos utilizados em micologia médica. In: ZAITZ, C. et al. *Compêndio de Micologia Médica*. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p. 393-403.
- Davis, N.D., Iyer, S.K., & Diener, U.L. (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied Environmental Microbiology*, 53(7), 1583- 1595.
- Duran, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., Souza, G. IH. & Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticle by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*, 3:8.
- Disponível em:  
<<http://monographs.iarc.fr/eng/classification/classificationsalphaorder>>. Acesso em: 08 abr.2016.
- Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc17db804f45fe2cbd41fdd785749fbd/Resolu%C3%A7%C3%A3o+0-2011-GGALI.pdf?MOD=AJPERES>> . Acesso em: 08 abr.2016.
- Espinel-Ingroff, A., Chaturvedi, V., Fothergill, A., & Rinaldi, M. G. (2002). Optimal testing conditions for determining mics and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: nccls collaborative study.

*Journal of Clinical Microbiology*, 40 (10), 3776-3781.

Feng, Q.L. *et al.* (2000). A mechanist study of the antibacterial effects of silver. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.52, n.4, p. 664-668.

Fernandez, A., Picouet, P., & Lloret, E. (2010). Cellulose silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 2263-2269.

Fernandez, A., Picouet, P., & Lloret, E. (2010). Reduction of the spoilage-related microflora in absorbent pads by silver nanotechnology during modified atmosphere packaging of beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 73(12), 222-228.

Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribellarea, J.L., Goma, G., Loubiere, P. (2000). Kinect analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 619-625.

Haighton, L.A., Lynch, B.S., Magnuson, B.A., & Nestmann, E.R. (2012). A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical Reviews in Toxicology*. 42, 147–168.

Heussner, A.H., & Bingle, L.E.H (2015). Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data. *Toxins*, 7(10), 253-4282.

Hernández-Sierra, J.F., Rui, F., Pena, D.C., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez, A. E., Guillén Ade, J., Tapia-Perez, H. & Castañón, G. M. (2008). The antimicrobial sensivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinco oxide and gold. *Nanomedicine*, 4(3), 237-240.

Gupta, A., Maynes, M., & Silver, S. (1998). Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escharichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 64 (12): 5042-5045.

Jin, J., YIP, H. Q., Samaranayake, Y.H., Yau, J.Y., & Samaranayake, L.P. (2003). Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human. *Immunodeficiency Virus Infection*, 41(7), 2961- 2967.

Kim, K.J., Sung, W.S., Moon, S.K., Choi, J.S., Kim, J.G., & Lee, D.G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of Microbioly and Biotechnology*, 8, 1482–1484.

Liu, G., Velluci, V.F., Kyc, S. & Hostetter, M. K. (2009). Simvastatin inhibits *Candida albicans* biofilm *in vitro*. *Pediatric Research*, 66, 600–604.

Lok, C.N.; Ho, C.M.; Chen, *et al.* (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v.5, n.4, p.916-924.

- Lorenz, R. T., & Parks, L. W. (1990). Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 34(9), 1660–1665.
- Makun, H. A., Dutton, M. F., Njobeh, P. B., Gbodi, T. M., & Ogbadu. G. H. (2012). Aflatoxin contamination in foods and feeds: A special focus on Africa. In: *Trends in Vital Food and Control Engineering*, Prof. Ayman Amer Eissa (Ed.), ISBN: 978-953-51-0449-0, InTech.
- Mapari, S.A.S., Hansen, M.E., Meyer, A.S., Thrane, U. (2008). Computerized screening for novel producers of *Monascus*-like food pigments in *Penicillium* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9981-9989.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., & Tsuchido T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4278-4281.
- Menezes, E. A., Vasconcelos Júnior, A.A., Silva, C.L., Plutarco, F.X., Cunha Mda, C., & Cunha, F. A. (2012). *In vitro* synergism of simvastatin and fluconazole against *Candida* species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54(4), 197-199.
- Mishra, N. N., Prasad, T., Sharma, N., & Gupta, D.K. (2008). Membrane fluidity and lipid composition of fluconazole resistant and susceptibles strains of *Candida albicans* isolated from diabetics patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 219-225.
- Mousavi, S.A., & Pourtalebi, S. (2015). Inhibitory effects of silver nanoparticles on growth and aflatoxin B1 productions by *Aspergillus parasiticus*. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 40(6), 501-6.
- Njobeh, B. P., Dutton, F. M., & Makun, H. A. (2010). Mycotoxins and human health: Significance, prevention and control. In: *Smart Biomolecules in Medicine*.
- Nyilasi, I., Kocsubé, S., Krizsán, K., Galgóczy, L., Pest, M., Papp, T. & Vágvolgyi, C. (2010). *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 307(2), 175–184.
- Panacek, A, Kvítek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerová, R., Pizurová, N., Sharma, V.K., Nevečná, T., & Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 16248–16253.
- Pizzolitto R.P., Bueno, D.J, Armando, M. R., Cavaglieri, L., Dalcero, A. M., & Salvado, M. A. (2011). Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. In: GUEVARA-GONZALEZ, R. G. Aflatoxins - *Biochemistry and Molecular Biology*. p. 323 – 346.
- Qiao, J., Kontoyiannis, D. P., Wan, Z., Li, R., & Li, W. (2007). Antifungal activity of

statins against *Aspegillus* species. *Medical Mycology*, 45 (7), 589-593.

Rocha, M. E. B., Freire, F. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., & Rodina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36, 159-165.

Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.275, n.1, p.177-182.

Strosnider, H. E., Azziz-Baumgartner, M., Banziger, M., Bhat, R. V., Breiman, R., Marie-Noel, B., and et al. (2006). Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 114, 1898–1903.

Streit E., Schatzmayr G., Tassis P., Tzika E., Marin D., Taranu I., Tabuc C., Nicolau A., Aprodu I., Puel O., & Oswald, I. P. (2012). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins*, 4, 788–809.

Viegas, C., Dias, R., Quintal Gomes, A., Meneses, M., Sabino, R., & Viegas, S.(2014). *Aspergillus flavus* contamination in two portuguese wastewater treatment plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 77, 796- 805.

Terzi, V., Tumino, G., Stanca, M. A., & Morica, C. (2014). Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science*. 59(3), 284- 293.

Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M, F, N., Hamed, M, I., Sobeira, T.J.P., Hedrick, V.E., Paul, L.N., & Seleem, M, N. (2015). Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. *Scientific Reports*. 5: 16407.

Van Vuuren, S.,& Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77(11), 1168-82.

Yehia, R. S. (2014). Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleutorus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiololy*, 45(1), 127-1.

## ANEXOS

Tabela 1. Valores de halos observados em milímetros utilizando o composto sinvastatina nas concentrações de 50 – 6.25 µg/disco incubados à 30 °C por 48 horas.

Tabela 2. Tamanho de halos observados em milímetros utilizando o composto sinvastatina nas concentrações de 250 – 3.9 µg/poço incubados à 30 °C por 48 horas.

Tabela 3: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da sinvastatina e AgNP individualmente e em combinação (SIN + AgNP) contra o crescimento de diferentes espécies de *Aspergillus* isoladamente (CIM), em interação (SIN + AgNP) e a concentração inibitória fracionária (FIC) dos resultados observados dos compostos e sua interação.

Tabela 4: Concentração fungicida mínima de sinvastatina e nanopartícula de prata (µg/mL), testados isoladamente contra diferentes espécies de *Aspergillus*.

Figura 1. A) Espectro de absorção UV-Vis das nanopartículas de prata sintetizadas. CO: comprimento de onda; Abs: absorbância em nanômetros (nm). Banda plasmônica observada em 445 nm. B, C, D) Distribuição do tamanho por intensidade, volume e número, respectivamente. Tamanho médio das nanopartículas foi de 91,84 nm. E) Medida do potencial Zeta, em mV (suspensão com valores maiores que +30mV ou menores que -30mV são estáveis e menos agregáveis).

Figura 2. Determinação das micotoxinas sob luz UV em Agar leite de coco, incubadas por 72 hrs a 30 °C. As setas ao redor da borda das colônias indicam áreas com fluorescência, característica apresentada por fungos produtores de aflatoxina ou ocratoxina.

A. *flavus*; B) *A. parasiticus*; C) *A. nomius*; D) *A. ochraceus*; E) *A. melleus*;



Figura 3. Efeito *in vitro* da sinvastatina (SIN), nanopartícula de prata (AgNP) testadas isoladamente ou em interação (SIN + AgNP) em 4 diferentes concentrações (CIM, 2x,4x e 8xCIM) contra a formação de biofilme gerado por *A. flavus* (A); *A. melleus* (B); *A. nomius* (C); *A. ochraceus* (D); *A. parasiticus* (E); em microplacas contendo meio RPMI acrescido dos compostos. A barra negra representa o controle positivo. Absorbância do cristal violeta (470nm). \*Representa diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparado com o controle positivo.

Figura 4. Imagens obtidas pelo método de microscopia eletrônica de varredura do efeito antifúngico de sinvastatina, AgNP e a interação dos compostos contra *A. flavus* após 24 h de tratamento. A e B: grupo controle, sem tratamento; C e D: tratamento com 78  $\mu\text{g/mL}$  (CIM) de sinvastatina; E e F: tratamento com 8  $\mu\text{g/mL}$  (CIM) de AgNP; G e H: tratamento com 19,5  $\mu\text{g/mL}$  (CIM) de sinvastatina mais 2  $\mu\text{g/mL}$  (CIM) de AgNP. Diferentes alterações podem ser observadas.

Figura 5. Imagens obtidas pelo método de microscopia eletrônica de varredura do efeito antifúngico de sinvastatina, AgNP e a interação dos compostos contra *A. ochraceus* após 24 h de tratamento. A e B: grupo controle, sem tratamento; C e D: tratamento com 19,5  $\mu\text{g/mL}$  (CIM) de sinvastatina; E e F: tratamento com 4  $\mu\text{g/mL}$  (CIM) de AgNP; G e H: tratamento com 9,75  $\mu\text{g/mL}$  de sinvastatina mais 1  $\mu\text{g/mL}$  de AgNP (CIM).

TABELA 1

Tabela 1. Valores de halos observados em milímetros utilizando o composto sinvastatina nas concentrações de 50 – 6.25 µg/disco incubados à 30 °C por 48 horas.

Cepas	Disco difusão (mm)			
	Concentração Sinvastatina (µg/disco)			
	50	25	12.5	6.25
<i>A. flavus</i>	> 30	>30	14.58 ± 0.95	9.91 ± 1.89 *
<i>A. melleus</i>	20.1 ± 0.6	14.9 ± 0.04	9.76 ± 1.12 *	SF
<i>A. nomius</i>	22.51 ± 3.1	16.17 ± 0.8	SF	SF
<i>A. ochraceus</i>	21.32 ± 1.8	15.15 ± 1.05	14.57 ± 3 *	SF
<i>A. parasiticus</i>	10.14 ± 0.007 *	5.66 ± 1.2 *	SF	SF

\* Pequenas Colônias ao redor do halo

SF Sem formação de halo

>30 Halo maior que 30 mm

**TABELA 2**

Tabela 2. Tamanho de halos observados em milímetros utilizando o composto sinvastatina nas concentrações de 250 – 3.9 µg/poço incubados à 30°C por 48 horas.

Cepas	Poço difusão (mm)						
	Concentração Sinvastatina (µg/poço)						
	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9
<i>A. flavus</i>	>30	>30	>30	26 ± 0.04	21.3 ± 3.5	15 ± 1.9*	11 ± 1.6*
<i>A. melleus</i>	>30	>30	21.7 ± 1.9	15.9 ± 0.5	6.7 ± 0.77*	SF	SF
<i>A. nomius</i>	>30	>30	25.6 ± 0.7	18. ± 1.2	14 ± 0.74*	SF	SF
<i>A. ochraceus</i>	>30	>30	23 ± 0.67	15.6 ± 2.3	14 ± 0.97	SF	SF
<i>A. parasiticus</i>	>30	>30	18.6 ± 0.9	14.64 ± 2	13 ± 0.8*	SF	SF

\* Pequenas colônias ao redor do halo

SF Sem formação de halo

>30 Halo maior que 30 mm

**TABELA 3**

Tabela 3: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da sinvastatina e AgNP individualmente e em combinação (SIN + AgNP) contra o crescimento de diferentes espécies de *Aspergillus* isoladamente (CIM), em interação (SIN + AgNP) e a concentração inibitória fracionária (CIF) dos resultados observados dos compostos e sua interação.

Cepas fúngicas	Antifúngico	CIM isolado	CIM interação	CIF
<i>A. flavus</i>	Sinvastatina	78 µg/mL	19,5 µg/mL	0.5
	AgNP	8 µg/mL	2 µg/mL	Sinergismo
<i>A.melleus</i>	Sinvastatina	19,5 µg/mL	0,305 µg/mL	1
	AgNP	4 µg/mL	4 µg/mL	Aditismo
<i>A. nomius</i>	Sinvastatina	78 µg/mL	19,5 µg/mL	0.75
	AgNP	8 µg/mL	4 µg/mL	Aditismo
<i>A.ochraceus</i>	Sinvastatina	19,5 µg/mL	9,75 µg/mL	0.75
	AgNP	4 µg/mL	1 µg/MI	Aditismo
<i>A. parasiticus</i>	Sinvastatina	78 µg/mL	19,5 µg/mL	0.5
	AgNP	8 µg/mL	2 µg/mL	Sinergismo

CIM: concentração inibitória mínima; CIF: concentração inibitória fracionaria foi calculado como anteriormente descrito. AgNP: nanopartícula de prata; CIM interação: SIN + AgNP.

TABELA 4

Tabela 4: Concentração fungicida mínima de sinvastatina e nanopartícula de prata ( $\mu\text{g/mL}$ ), testados isoladamente contra diferentes espécies de *Aspergillus*.

Cepas fúngicas	CIM/ CFM SIN $\mu\text{g/mL}$	CIM/ CFM AgNP $\mu\text{g/mL}$
<i>A. flavus</i>	78/ 312	8/ 64
<i>A. melleus</i>	19,5/ 78	4/ 16
<i>A. nomius</i>	78/ 312	8/ 32
<i>A. ochraceus</i>	19,5/ 78	4/ 16
<i>A. parasiticus</i>	78/ 312	8/ 32

AgNP Nanopartícula de prata

CFM Concentração Fungicida Mínima

CIM Concentração Inibitória Mínima

SIN Sinvastatina

FIGURA 1

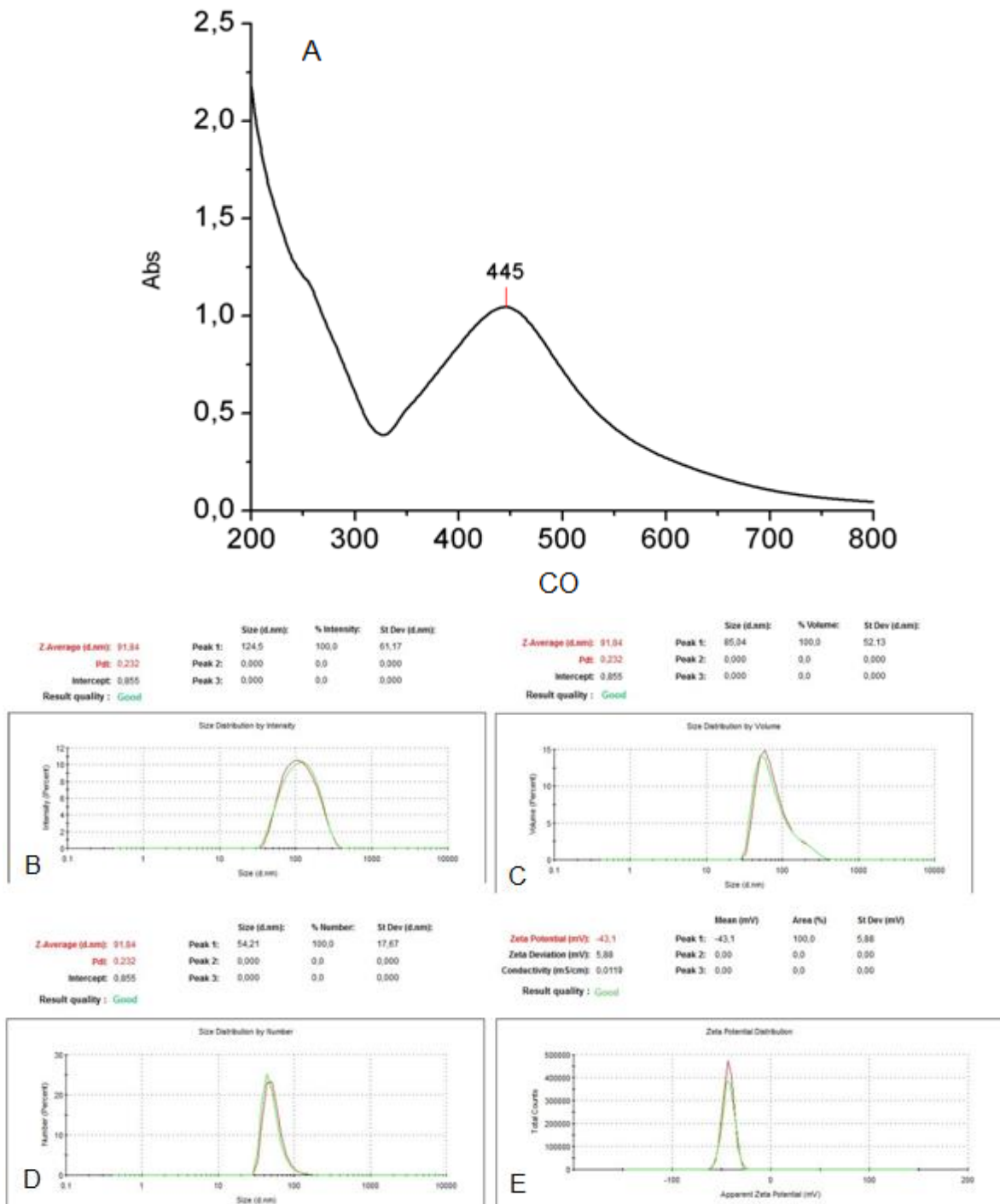


Figura 1. A) Espectro de absorção UV-Vis das nanopartículas de pratasintetizadas. CO: comprimento de onda; Abs: absorvância em nanômetros (nm). Banda plasmônica observada em 445 nm. B, C, D) Distribuição do tamanho por intensidade, volume e número, respectivamente. Tamanho médio das nanopartículas foi de 91,84 nm. E) Medida do potencial Zeta, em mV (suspensão com valores maiores que +30mV ou menores que -30mV são estáveis e menos agregáveis).

FIGURA 2

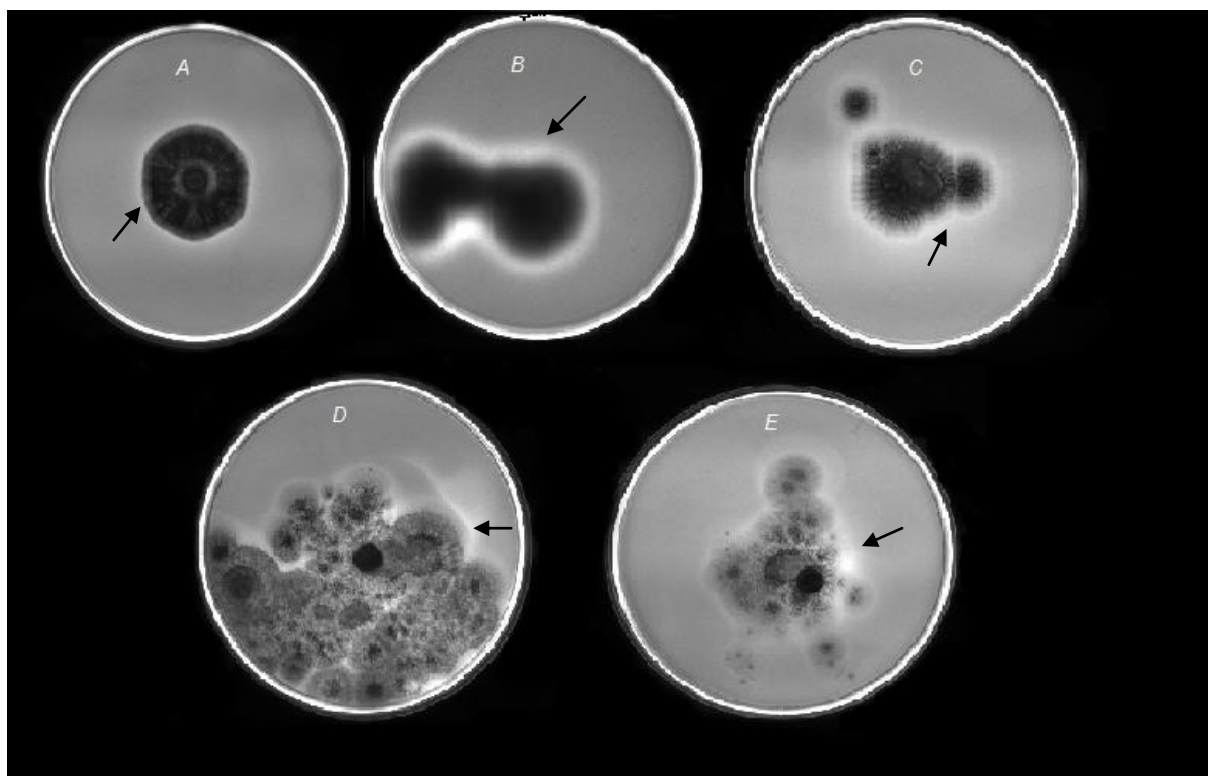


Figura 2. Determinação das micotoxinas sob luz UV em Agar leite de coco, incubadas por 72 hrs a 30 °C. As setas ao redor da borda das colônias indicam áreas com fluorescência, característica apresentada por fungos produtores de aflatoxina ou ocratoxina.

A. *flavus*; B) *A. parasiticus*; C) *A. nomius*; D) *A. ochraceus*; E) *A. melleus*;

FIGURA 3

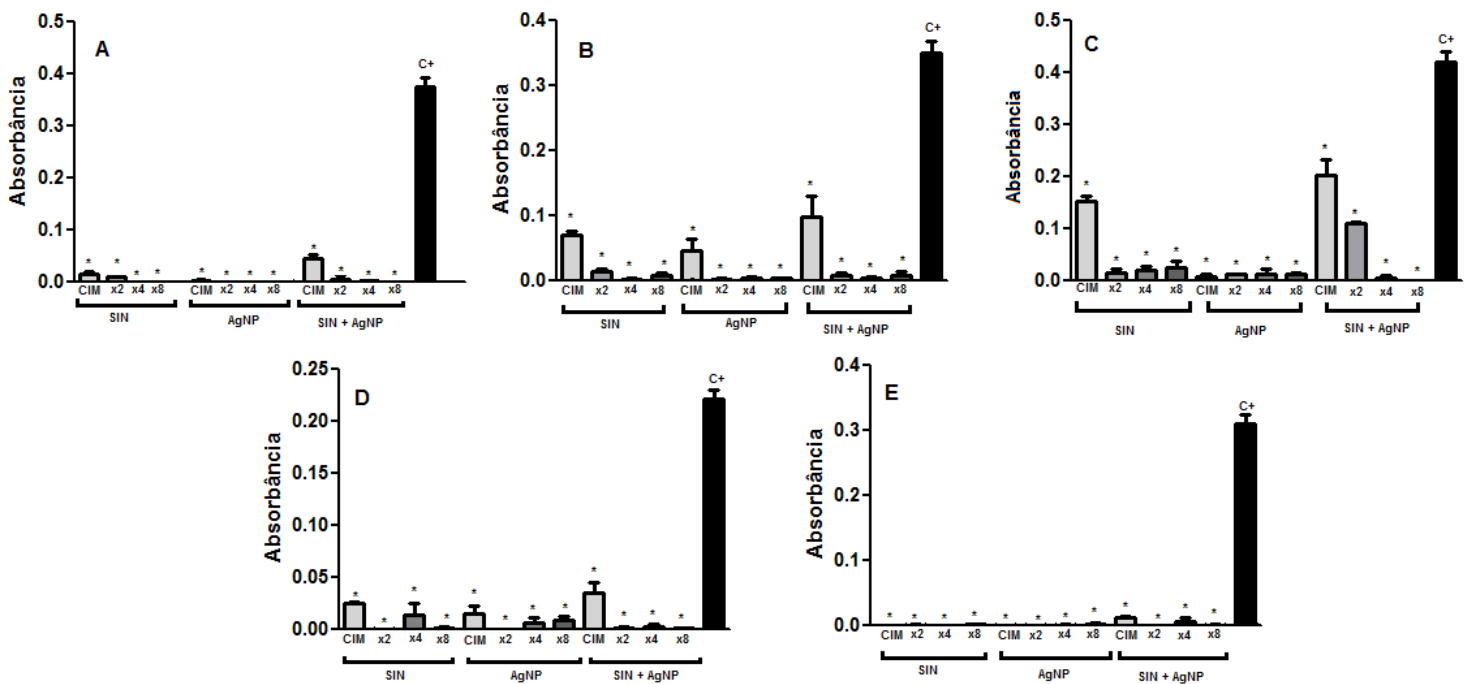


Figura 3. Efeito *in vitro* da sinvastatina (SIN), nanopartícula de prata (AgNP) testadas isoladamente ou em interação (SIN + AgNP) em 4 diferentes concentrações (CIM, 2x, 4x e 8xCIM) contra a formação de biofilme gerado por *A. flavus* (A); *A. melleus* (B); *A. nomius* (C); *A. ochraceus* (D); *A. parasiticus* (E); em microplacas contendo meio RPMI acrescido dos compostos. A barra negra representa o controle positivo. Absorbância do cristal violeta (470nm). \*Representa diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparado com o controle positivo.



FIGURA 4

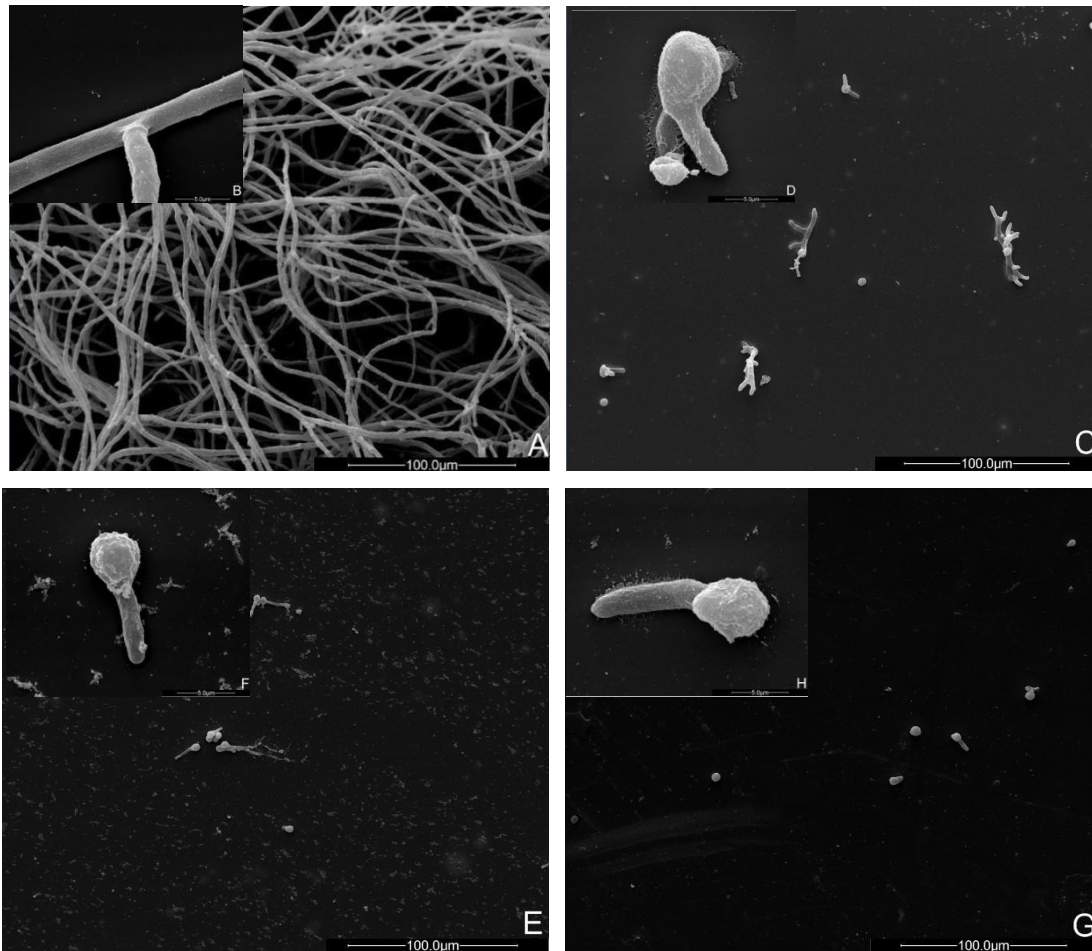


Figura 4. Imagens obtidas pelo método de microscopia eletrônica de varredura do efeito antifúngico de simvastatina, AgNP e a interação dos compostos contra *A. flavus* após 24 h de tratamento. A e B: grupo controle, sem tratamento; C e D: tratamento com 78 µg/mL (CIM) de simvastatina; E e F: tratamento com 8 µg/mL (CIM) de AgNP; G e H: tratamento com 19,5 µg/mL (CIM) de simvastatina mais 2 µg/mL (CIM) de AgNP. Diferentes alterações podem ser observadas.

FIGURA 5

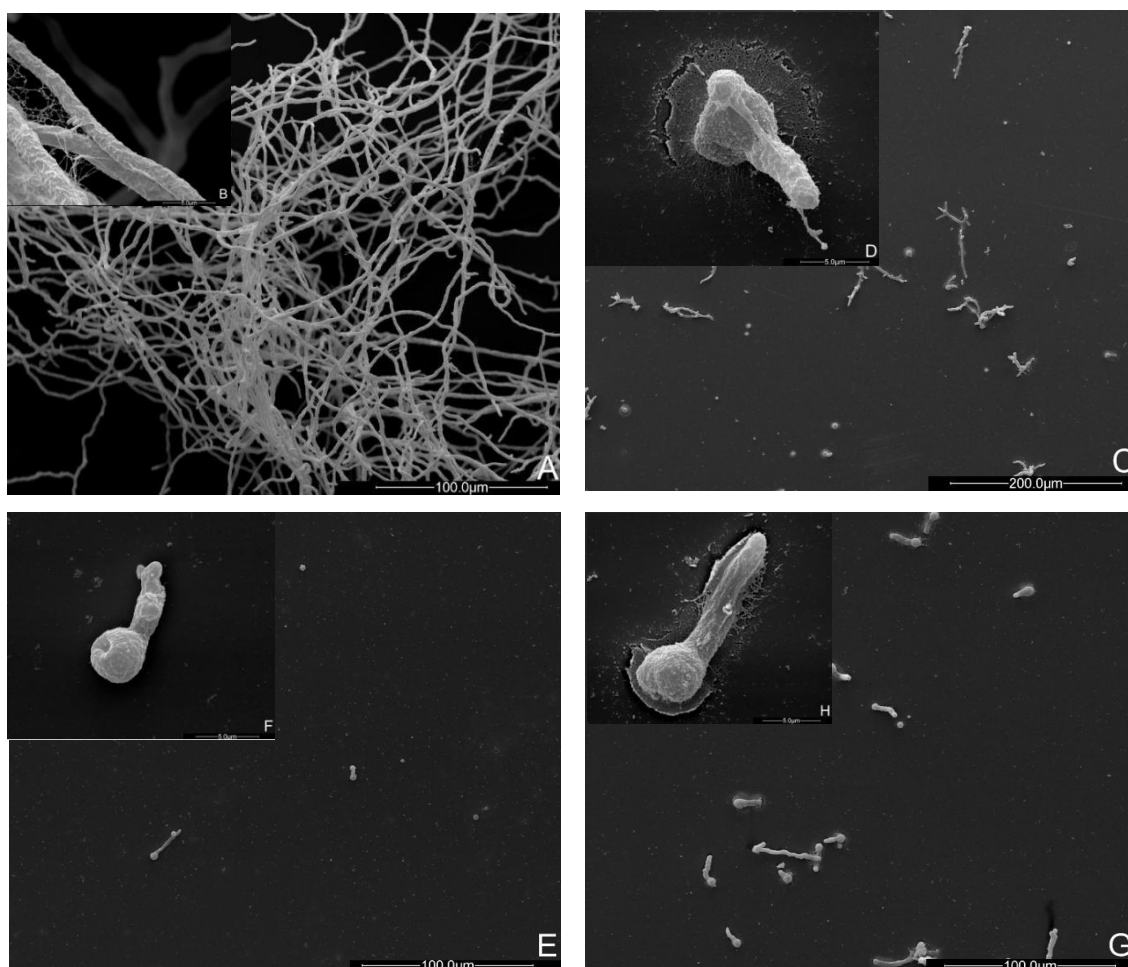


Figura 5. Imagens obtidas pelo método de microscopia eletrônica de varredura do efeito antifúngico de simvastatina, AgNP e a interação dos compostos contra *A. ochraceus* após 24 h de tratamento. A e B: grupo controle, sem tratamento; C e D: tratamento com 19,5 μg/mL (CIM) de simvastatina; E e F: tratamento com 4 μg/mL (CIM) de AgNP; G e H: tratamento com 9,75 μg/mL de simvastatina mais 1 μg/mL de AgNP (CIM).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a utilização isolada tanto de sinvastatina como de nanopartículas de prata biogênicas apresentam potencial antimicrobiano contra fungos toxigênicos. Teste para determinação da concentração inibitória mínima balizaram a realização da técnica de checkerboard, onde verificamos efeito sinérgico ou aditivo das substâncias, dependendo da espécie de *Aspergillus* analisada. A concentração fungicida mínima foi determinada, sendo que os compostos utilizados isoladamente apresentaram ação fungicida em concentrações 4 a 8 vezes, comparativamente à CIM. A sinvastatina e AgNP foram eficazes na inibição de formação de biofilme, isoladamente ou em combinação. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de esporos e hifas de *A. flavus* e *A. ochraceus* submetidos às concentrações obtidas na CIM demonstram danos às estruturas fúngicas. Houve inibição da germinação da maior parte dos esporos e, naqueles que germinaram, houve formação e tubo germinativo defeituoso. Alterações morfológicas e formas pouco convencionais foram verificadas nas hifas, assim como perda de matriz extracelular. Estes compostos, portanto, apresentam um grande potencial de aplicação em áreas onde fungos toxigênicos definem a qualidade e destinação dos alimentos: conservação de grãos; revestimento de sementes; limpeza de silos; na indústria de alimentos (embalagens).