

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Microbiologia

Dissertação de Mestrado

**Diversidade e bioprospecção de fungos presentes em  
lagos Antárticos**

Vívian Nicolau Gonçalves

Belo Horizonte  
2011

Vívian Nicolau Gonçalves

## **Diversidade e bioprospecção de fungos presentes em lagos Antárticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Carlos Augusto Rosa

Co-orientador: Prof. Luiz Henrique Rosa

Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras – ICB/UFMG

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2011

Colaboradores:

Ms. Aline Bruna Martins Vaz<sup>1</sup>

Dr. Carlos Leomar Zani<sup>2</sup>

Dr. Tânia Maria de Almeida Alves<sup>2</sup>

1. Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras – ICB/UFMG
2. Laboratório de Química de Produtos Naturais–Instituto René Rachou/FIOCRUZ

## **Agradecimentos**

À Deus pela oportunidade de vida e por me apresentar infinitas possibilidades de aprender, crescer e ser melhor, sempre;

Ao Prof. Carlos A. Rosa pela orientação. Agradeço as oportunidades que me foram concedidas e todos os ensinamentos de extrema importância para o trabalho e para o meu crescimento profissional. É um grande privilégio fazer parte da equipe de trabalho de um profissional que confio e admiro;

Ao Prof. Luiz H. Rosa pela orientação e pela confiança. Agradeço todas as oportunidades concedidas, os ensinamentos e o apoio constante. Sua ajuda e amizade foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço ao Prof. Revisor, Ary Corrêa Júnior, desta dissertação pelas correções e contribuições;

Aos membros da banca examinadora, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira e Vivian Helena Pellizari, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que foram muito importantes para a melhoria deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia pela oportunidade; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial à Fatinha e ao Douglas;

À Mestre Aline Bruna Vaz pela preciosa colaboração neste trabalho. Sua ajuda foi indispensável na coleta das amostras. Desejo todo sucesso do mundo na sua carreira.

Ao Doutor Carlos Zani e a Doutora Tânia M<sup>a</sup> Alves pela colaboração e permissão para utilizar a infraestrutura do Laboratório de Química de Produtos Naturais

(LQPN). Aos amigos do LQPN: Tânia Alves, Betânia Cota, Fernanda Campos, Márcia Rodrigues, Daniela Nabak, Patrícia, Luciana, Carol e Ezequias Pessoa pelos momentos agradáveis e pelas ajudas do dia-a-dia;

Ao Jamil do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de proteínas pela disposição e ajuda na secagem dos extratos.

Aos amigos do laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras pelos bons momentos que compartilhamos e pelo apoio que me deram: Alice, Aline Bruna, Anne Caroline, Antônio César, Bárbara Muniz, Bruno Resende, Camila Gontijo, Camila Rodrigues, César Faria, Cibele, Cristiane Bigatti, Débora Gonçalves, Denise Scoaris, Fátima, Fernanda Piló, Gabriella Breder, Helen Cristina, Iara Santiago, Inayara, Larissa, Laura Esteves, Lília, Lindiane, Lorena, Luciana Brandão, Mariana Costa, Mariana Rezende, Mariana Vieira, Michelle, Monaliza, Mônica Ricão, Natália Pereira, Nayara, Núbia, Paula Moraes, Paula São Thiago, Priscila, Raquel Cadete, Renata Santos, Silvana Safer, Susana Johann, Valéria Godinho, Valéria de Macedo e Victor. Um agradecimento especial à Lú pela prontidão em tirar as dúvidas; à Mari Vieira e Aline pela força que sempre me deram; aos companheiros de bandeijão por fazerem mais agradável as horas de almoço;

Em especial, à minha irmã gêmea Camila por toda ajuda, companheirismo e amizade em todas as horas. Com certeza as horas de trabalho foram mais divertidas e prazerosas em sua companhia. Desejo a você muitas vitórias!

Ao Thiago e a Lorena pela disponibilidade e disposição em ajudar. Ainda que tenha sido curto o tempo, foi bastante precioso. Desejo muito sucesso a vocês!

À Cristiane Bigatti e Suzana Johan, agradeço pela atenção, disponibilidade em ensinar e ajudar e pelas importantes dicas que me ajudaram na realização dos ensaios para determinação da atividade antifúngica dos extratos;

Ao pessoal do LBEM (UFMG) e LPCM (IRR) por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a realização dos sequenciamentos;

A todos os professores e colegas do curso de Pós-graduação em Microbiologia pelos ensinamentos, incentivo e convivência agradável.

A minha família querida, agradeço aos meus pais (José Miguel e Tânia) por toda dedicação, apoio e amor. Como em tudo que faço vocês são meus exemplos de vida e fazem parte desse projeto. As minhas irmãs, Virgínia e Raquel, por todos os momentos que passamos juntas, dividindo alegrias e risadas e por toda amizade e compreensão. A todos os familiares pela torcida.

Ao Thiago pelo amor, companheirismo e compreensão. Obrigada também por estar sempre ao meu lado, nos momentos felizes e naqueles em que tanto precisei de sua ajuda, de seus conselhos e de um ombro mais que amigo.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS .....	16
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 Ecossistemas extremos .....	21
2.1.2 Lagos Antárticos .....	23
2.3 Diversidade de fungos em ecossistemas extremos.....	24
2.4 Bioprospecção de fungos em ecossistemas extremos.....	27
3. OBJETIVOS .....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Locais e procedimentos de coleta .....	33
4.2 Isolamento, cultivo e preservação de leveduras e fungos filamentosos .....	36
4.3 Identificação dos fungos .....	37
4.3.1 Extração do DNA total .....	37
4.3.2 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.....	38
4.3.3 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento .....	38
4.3.4 Análise computacional das sequências .....	40
4.4 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e equitabilidade .....	40
4.5 Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos brutos .....	41
4.5.1 Fungos filamentosos .....	41
4.5.2 Leveduras .....	41
4.6 Ensaio Biológicos .....	42
4.6.1 Determinação da atividade antifúngica .....	42
4.6.2 Padronização dos inóculos .....	43
4.6.3 Ensaio antifúngico.....	43
4.6.4 Ensaio com células tumorais humanas .....	45
4.6.5 Ensaio in vitro com a forma amastigota-like de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
5.1 Coleta e isolamento dos fungos.....	47

5.2 Identificação dos fungos .....	49
5.3 Diversidade da comunidade fúngica dos lagos .....	69
5.4 Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos metanólicos .....	82
5.5 Determinação da atividade antifúngica .....	83
5.6 Determinação da atividade antitumoral e antiparasitária .....	90
6. CONCLUSÕES .....	95
7. ANEXOS.....	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101



## Lista de figuras

- Figura 1: Mapa da baía do almirantado, na ilha Rei *George*, península Antártica mostrando os locais dos lagos em que as amostras foram coletadas: Sh = Stenhouse (62°04'221"s, 58°22'228"w), Rf = Refúgio II (62°04'088"s, 58°25'055"w), Mp = Macchu Picchu (62°05's, 58°19'w), Ag = Agat (62°11'892"s, 58°26'484"w) e Wd = Wanda (62°04'762"s, 58°19'505"w) (Simões *et al.*, 2004 com modificações). ..... 34
- Figura 2: mapa topográfico da ilha *Deception*, península Antártica, indicando o lago *Crater lake*. ..... 35
- Figura 3: Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios antifúngicos. .... 45
- Figura 4: Total de fungos filamentosos isolados em cada lago: Sh= Stenhouse, Wd= Wanda, Mp= Macchu Picchu, Cl= *Crater Lake*, Rf= Refúgio II e Ag= Agat. .... 48
- Figura 5: Distribuição em porcentagem dos isolados obtidos dos lagos antárticos.. 50
- Figura 6: Árvores filogenéticas (A a G) mostrando a relação entre os isolados de fungos isolados de lagos antárticos e sequências obtidas do GenBank. O número de acesso das sequências retiradas do program blastn encontra-se entre parênteses. As sete árvores foram construídas baseadas em fragmentos da região *its* do *rrna* utilizando o método de *neighbor-joining*, parâmetro composto máximo de likelihood. Uma análise de *bootstrap* foi realizada com 1.000 repetições. *Trametes versicolor* (AFO42324) foi usado como grupo externo. Somente foram construídas arvores filogenéticas para os isolados que apresentaram sequências com identidade menor do que 98%..... 68
- Figura 7: Dendrogramas ilustrando o perfil de similaridade apresentado pelos índices de Sorensen (a) e de Bray-curtis (b) das comunidades de fúngicas dos seis lagos amostrados na antártica. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições. .... 81

- Figura 8: Total de extratos fúngicos produzidos a partir de leveduras e fungos filamentosos isolados de seis lagos antárticos. .... 82
- Figura 9: Porcentagem dos extratos fúngicos testados considerados promissores (inibição  $\geq 70\%$ ), medianamente promissores (inibição entre 50 e 69%) e não promissores (inibição  $< 50\%$ ), frente ao crescimento de linhagens clínicas de *Candida albicans* e do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. A: avaliação da inibição frente ao crescimento de pelo menos uma linhagem de *C. albicans*. B: avaliação da inibição frente ao crescimento de *P. brasiliensis*. C: porcentagem de extratos considerados promissores e medianamente promissores em relação a cada linhagem de *C. albicans* testada. .... 86
- Figura 10: Porcentagem de extratos fúngicos promissores, medianamente promissores e não promissores frente ao crescimento das linhagens de *Candida albicans*, obtidos dos fungos isolados de cada lago estudado. Lagos: Sh = Stenhouse, Mp = Macchu Picchu, Rf = refúgio II, Wd = Wanda, Ag = Agat e Cl = crater lake. .... 88
- Figura 11: Porcentagem de extratos fúngicos promissores, medianamente promissores e não promissores frente ao crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis*, obtidos dos fungos isolados de cada lago estudado. Lagos: Sh = Stenhouse, Mp = Macchu Picchu, Rf = Refúgio II, Wd = Wanda, Ag = Agat e Cl = Crater Lake. .... 88

## Lista de tabelas

Tabela 1: Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados dos lagos antárticos, por meio da análise das sequencias da região ITS do gene do RNA ribossomal.....	51
Tabela 2: Número de isolados e porcentagem de abundância dos fungos obtidos dos seis lagos antárticos. ....	72
Tabela 3: Localização geográfica, contagem de fungos totais, índices de diversidade e características físico-químicas dos lagos amostrados.....	80
Tabela 4: Fungos isolados de lagos antárticos capazes de inibir pelos menos um dos alvos usados nos ensaios biológicos.....	93

## Resumo

No continente antártico, os lagos constituem os habitats mais favoráveis ao crescimento de microrganismos extremófilos, os quais podem ser importantes fontes de metabólitos bioativos. Diversos trabalhos têm sido realizados para avaliar a diversidade de fungos presentes em diferentes substratos na Antártica. Contudo poucos estudos têm sido realizados para avaliar a diversidade de fungos presentes nas águas de lagos e a capacidade desses microrganismos de produzir metabólitos secundários com atividade biológica. O objetivo deste trabalho foi coletar amostras de água de seis lagos da Baía do Almirantado, na Ilha Rei *George* (lagos Stenhouse, Macchu Picchu, Refúgio II, Wanda e Agat) e na Ilha Deception (lago *Crater lake*), na Antártica, para isolamento de fungos filamentosos. Além disto, foi avaliada a capacidade destes microrganismos de produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica, antitumoral e antiparasitária. Foram obtidos 128 fungos filamentosos, a partir de 90 amostras de água. Os isolados de fungos obtidos foram agrupados em 99 morfotipos distintos de acordo com as características macroscópicas das colônias, e um isolado de cada grupo foi selecionado para identificação molecular por meio de sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do RNA ribossomal. Dentre os táxons obtidos, 17,5% são considerados espécies endêmicas e estão distribuídos entre os gêneros: *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Davidiella*, *Fontanospora*, *Geomyces*, *Gibberella*, *Helgardia*, *Microdochium*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus* e *Trichoderma*. A espécie *Geomyces pannorum* foi a mais frequente (13,5%) e o maior número de isolados foi obtido do lago Stenhouse (26%), o qual apresentou a maior diversidade de acordo com os índices de Shannon e Simpson. Em relação à similaridade da comunidade de fungos estimada pelos coeficientes de Sorensen (*QS*) e Bray-Curtis, os lagos Macchu Picchu/Wanda e Refúgio II/Wanda, respectivamente, apresentaram maior semelhança entre as comunidades de fungos. Os diferentes valores de similaridade atribuídos aos lagos amostrados podem ser devido às diferentes características físico-químicas encontradas nos diferentes ecossistemas estudados. Duzentos e vinte extratos metanólicos foram obtidos a partir do crescimento de fungos filamentosos (58%) e das leveduras antárticas (42%) isoladas por Brandão, (2010). Os extratos foram testados quanto à capacidade de inibir linhagens oportunistas de

*Candida albicans* (ATCC 18804, 2.1A e 15.3C) e o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18), na concentração de 250µg/mL. Além disso, os extratos foram avaliados quanto à capacidade de inibir células de *Leishmania amazonensis* e linhagens de células tumorais humanas (TK-10 e MCF-7) na concentração de 20µg/mL. Em relação aos ensaios com as linhagens de *C. albicans*, 19 (8,64%) extratos de fungos filamentosos foram considerados promissores (atividade inibitória ≥70%). A maior parte dos extratos considerados promissores e medianamente promissores (atividade inibitória entre 50 e 69%) inibiram a linhagem de *C. albicans* 2.1A, resistente ao itraconazol. Em relação aos ensaios com o fungo *P. brasiliensis* 14 extratos (8,2%) foram considerados promissores. Do total de extratos testados nos ensaios realizados com todos os microrganismos e células alvos, 31 foram ativos, sendo a maioria obtida de fungos filamentosos. O maior número de extratos promissores foi obtido de fungos isolados do lago Stenhouse. Os táxons de leveduras que apresentaram atividade sobre *P. brasiliensis* foram *Rhodotorula* sp., *Exophiala heteromorpha* e *Cryptococcus victoriae*. Os fungos filamentosos que apresentaram atividade biológica em pelo menos um dos ensaios realizados estão distribuídos entre os gêneros *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Microdochium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudeurotium* e *Thelebolus*. A espécie que apresentou o maior número de extratos com atividade inibitória sobre pelo menos um microrganismo ou célula alvo (19,4%) foi *G. pannorum*. Nenhum extrato foi capaz de inibir as células de *L. amazonensis*. Os táxons *Leucosporidiella muscorum* e *Penicillium* sp. apresentaram atividade sobre as linhagens de células tumorais. Os resultados obtidos neste trabalho revelam a importância da realização de estudos para o conhecimento da diversidade e bioprospecção da micota presente nos lagos antárticos. Também sugerem que estes ambientes constituem uma fonte promissora de fungos produtores de metabólitos bioativos possíveis protótipos para o desenvolvimento de drogas com atividade antifúngica e antitumoral.

## Abstract

In Antarctic continent, lakes are the most favorable habitats for the growth of extremophile microorganisms, which can be important sources of bioactive metabolites. Several studies have been performed to evaluate the diversity of fungi isolated from different substrates of Antarctica. However, few studies have been performed to assess the diversity of fungi present in the water lakes and the ability of these microorganisms to produce secondary metabolites with biological activity. The aim of this study was to collect water samples from six Antarctic lakes of Admiralty Bay, at King George Island (lakes Stenhouse, Macchu Picchu, Refuge II, Agat and Wanda) and Deception Island (Crater Lake) in Antarctica for the isolation of fungi. Besides that, it was evaluated the ability of these microorganisms to produce secondary metabolites with antifungal, antitumor and antiparasitic activities. A hundred and eight filamentous fungi were obtained from 90 water samples. The fungal isolates were grouped into 99 distinct morphotypes according to their macroscopic characteristics of their colonies, and one isolate of each group was then selected to molecular identification by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of rRNA gene. Seventeen and a half percent of the taxa obtained in the lakes sampled are endemic species and belong to the genera: *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Davidiella*, *Fontanospora*, *Geomyces*, *Gibberella*, *Helgardia*, *Microdochium*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus* and *Trichoderma*. The species *Geomyces pannorum* (13.5% of the total isolates) was predominant and the highest number of isolates was obtained from Lake Stenhouse (26%), which showed the highest diversity showed by the Shannon and Simpson indices. The similarity of the fungal community of the lakes Macchu Picchu/Wanda and Refúgio II/Wanda, estimated by the coefficient of Sorensen (QS) and Bray-Curtis were more similar than the others. The different similarity values assigned to the lakes sampled may be due to the different physical and chemical characteristics found in the different ecosystems studied. Two hundred and twenty methanolic extracts were obtained [58% of filamentous fungi and 42% of Antarctic yeasts isolated by Brandão (2010)]. The extracts were tested at the concentration of 250µg/mL for their capacity to inhibit the growth of opportunistic

strains of *Candida albicans* (ATCC 18804, and 15.3C 2.1A) and the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). The extracts were also tested at the concentration of 20µg/mL for their capacity to inhibit cells of *Leishmania amazonensis* and cell lines of human tumor (TK-10 and MCF-7). In the bioassays against strains of *C. albicans*, 19 (8.64%) extracts of the fungi were considered promising (inhibitory activity  $\geq 70\%$ ). Most of the extracts considered promising and moderately promising (inhibitory activity between 50 and 69%) inhibited the strain of *C. albicans* 2.1A, resistant to itraconazole. In the bioassays against the fungus *P. brasiliensis*, 14 extracts (8.2%) were considered promising. From all extracts tested on the bioassays with all microorganisms and target cells, 31 were considered active, being most obtained from filamentous fungi. The highest numbers of promising extracts were obtained from filamentous fungi of Stenhouse lake. The yeasts that showed activity against *P. brasiliensis* were *Rhodotorula* sp., *Exophiala heteromorpha* and *Cryptococcus victoriae*. The filamentous fungi that showed biological activity were distributed among the genera *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Microdochium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudeurotium* and *Thelebolus*. *G. pannorum* was the species with largest number of extracts with biological activity (19.4%) against at least one microorganism or target cell. None of the extracts were able to inhibit the cells of *L. amazonensis*. The taxa *Leucosporidiella muscorum* and *Penicillium* sp. showed activity on tumor cell lines. The results of this research showed the importance of studies about diversity and bioprospecting of fungi in Antarctic lakes. It is been also suggested that environment represent a rich source for the isolation of strains producing bioactive metabolites that can have the potential to develop antifungal and antitumor drugs.

## Lista de abreviaturas

AFTS: Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee  
AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
ATCC: American Type Culture Collection  
B: Índice de Bray-Curtis  
BDA: Ágar dextrose batata  
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool  
Chl: clorofila  
CIM: Concentração Inibitória Mínima  
cm: centímetro  
CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbônico  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
DO: densidade óptica  
DO: oxigênio dissolvido  
EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EUA: Estados Unidos da América  
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
FES: Fermentação no estado sólido  
g: grama  
g/L: grama por litro  
GYMP: glicose, extrato de levedura, extrato de malte, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
H': Índice de Shannon  
H<sub>2</sub>O: água  
HCl: Ácido clorídrico  
hsp: hot shock protein  
ICB: Instituto de Ciências Biológicas



IRR/FIOCRUZ: Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

ITS: Região transcrita interna

Km<sup>2</sup>: quilômetros quadrados

LBEM: Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular

LQPN: Laboratório de Química de Produtos Naturais

M: molar

MCF-7: Célula de adenocarcinoma de mama humano

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

mg: miligrama

mg/L: miligrama/litro

mg/mL: miligrama/mililitro

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

mol/L : mol por litro

MOPS : ácido morfolinepropano sulfônico

mS/cm: Milisiemens por centímetro

MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico

mV: milivolt

µg: Micrograma

µg/mL: micrograma/mililitro

µmol: micromol

µl: Microlitro

NaCl: Cloreto de sódio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: dihidrogenofosfato de sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NCI: National Cancer Institute

ng: nanograma

nm: Nanômetro

orp: Oxidation reduction potential

P.A.: para análise

PAST: Palaeontological Statistics

PCM: Paracoccidioidomicose

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*

PCR: Reação em cadeia da polimerase  
PEG: polietilenoglicol  
pH: potencial hidrogeniônico  
pmol: Pico mol  
ppt: partes por trilhão  
QS: Índice de Sorensen  
q.s.p.: quantidade suficiente para  
rDNA: DNA ribossomal  
rRNA: RNA ribossomal  
r.p.m.: Rotações por minuto  
s: Segundo  
S: sul  
sat %: porcentagem de saturação  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SSF: Solid State Fermentation  
TBE: Tris borato  
TDS: Sólidos totais dissolvidos  
TK-10: Célula de câncer renal  
U: Unidade  
UFC: Unidade formadora de colônia  
UFC/g: Unidades formadoras de colônia por grama  
UFC/mL: Unidades formadoras de colônia por mililitro  
UFC/L: Unidades formadoras de colônias por litro  
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais  
UFMGCB : Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais  
UV: ultravioleta  
V: Volts  
YM: Ágar extrato de malte-extrato de levedura  
YPD: peptona de caseína, extrato de levedura, glicose e ágar  
W: oeste  
%: por cento  
°C: graus Celsius

## **1. Relevância e justificativa**

A península Antártica é conhecida por abrigar microrganismos extremófilos em seus diferentes habitats, como solo, rochas, lagos, aves, mamíferos e plantas. Embora nos últimos anos tenha aumentado os estudos sobre os ecossistemas antárticos em diferentes linhas de pesquisas, a diversidade microbiana nos lagos antárticos ainda é pouco conhecida. Neste contexto, a Península Antártica caracteriza-se pela pequena ocorrência de áreas livres de gelo, baixas temperaturas e baixa insolação. A região abriga lagos com extremos de temperaturas, pH e disponibilidade de nutrientes. Além disso, ocorre alta incidência de radiação solar, alternada por longos períodos de ausência de luz. A partir de ciclos de congelamento e descongelamento, os lagos antárticos são formados por água de degelo, e às vezes, recebem influência de água marinha, que é responsável por variações de salinidade. Apesar dessas características extremófilas, estes ambientes são os mais favoráveis ao crescimento de microrganismos na Antártica.

Diferentes trabalhos são realizados visando caracterizar a diversidade de organismos presentes nos ambientes aquáticos. Nesses ambientes, os microrganismos assumem um papel importante na participação dos ciclos biogeoquímicos e na ciclagem de nutrientes. Dentre os ambientes aquáticos, destacam-se aqueles em que estão presentes características extremas de temperatura, pH, salinidade, pressão, entre outros. Esses ambientes vêm sendo descritos como habitats de diferentes táxons de microrganismos extremófilos.

Os fungos capazes de crescer nos lagos da Antártica são denominados de psicrófilos e psicrotolerantes. A maioria desses microrganismos pertence ao grupo dos fungos negros (melanizados) e das leveduras basidiomicéticas. Esses microrganismos, constantemente expostos ao ambiente extremo, apresentam estratégias interessantes para se manterem vivos tais como, ativação de enzimas a baixas temperaturas, diferenças na composição lipídica da membrana e expressão de proteínas de choque térmico (hsp).

Dessa forma, os ambientes extremos, como os encontrados na península Antártica, são exemplos de uma rica fonte de microrganismos. As vias bioquímicas

utilizadas e as substâncias produzidas por esses microrganismos podem ser utilizadas em processos biotecnológicos que envolvam, por exemplo, a produção de enzimas a baixas temperaturas; ou ainda, a utilização de metabólitos secundários como possíveis protótipos para novos fármacos. Assim, microrganismos extremófilos presentes na Antártica podem ser utilizados para obtenção de produtos naturais (metabólitos secundários) com importante diversidade molecular e funcionalidade biológica. Portanto, pesquisas que visam caracterizar a diversidade em ambientes antárticos e verificar a produção por estes microrganismos de substâncias com atividade biológicas merecem destaque. Esses estudos podem contribuir para o conhecimento da biodiversidade e bioprospecção dos fungos presentes na Antártica, além de serem importantes para a conservação da microbiota desse ecossistema.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Ecossistemas extremos

Ambientes extremos são aqueles que possuem características físicas diferentes daquelas encontradas nos ambientes em que a maior parte dos organismos é capaz de sobreviver. De acordo com Oarga (2009), estudos sobre esses ambientes são importantes para investigações evolutivas, origem de novas espécies e relações ecológicas entre os organismos. As comunidades biológicas nos ambientes extremos são constituídas principalmente por microrganismos (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003), os quais são encontrados em substratos como, gelo, águas quentes e ácidas, cristais de sal, resíduos tóxicos e até águas de reatores nucleares (PEARCE, 2009).

As regiões polares representam habitats extremos, devido às características comuns, como baixa atividade de água e ocasionalmente grande concentração de sais, locais aonde os fungos presentes vem sendo estudados com maior frequência (KOGÉJ *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2009, 2010; LOQUE *et al.*, 2010; VAZ *et al.*, 2011). As baixas temperaturas, que induzem a formação de cristais de gelo no ambiente intracelular, provocam a redução da disponibilidade de água, fator limitante para as comunidades microbiológicas presentes em regiões polares (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003). Tais condições ambientais são encontradas na Antártica e resultam em fatores limitantes para o metabolismo, crescimento (COWAN & TOW, 2004) e biodegradação microbiana (GOCHEVA *et al.*, 2006), além disto, estes fatores atuando sobre os organismos podem possibilitar a descoberta de novas vias metabólicas e, conseqüentemente, novos metabólitos (OARGA, 2009).

A Antártica compreende um dos ambientes mais extremos da Terra (CONNELL *et al.*, 2006), onde somente cerca de 2% dos 14 milhões de Km<sup>2</sup> do continente são livres de gelo, o qual compreende extensas montanhas, cordilheiras e afloramentos costeiros (AZMI & SEPPELT, 1997). O continente Antártico é caracterizado pelo isolamento geográfico e climático e a maior parte possui pouca ou nenhuma influência antrópica (BRUNATI *et al.*, 2009). Além disso, a Antártica possui um clima frio e seco, com grande incidência de ventos e alta radiação solar durante a estação de verão (SHIVAJI & PRASAD, 2009). Essas características

peculiares fazem com que o nível de biomassa microbiana e a diversidade de espécies sejam significativamente menores nas regiões livres de gelo mais extremas da Antártica em comparação com ambientes temperados (COWAN & TOW, 2004).

Apesar das condições extremófilas presentes na Antártica, diferentes formas de vida são encontradas, como bactérias, leveduras, fungos, vegetais, pequenos invertebrados e muitas espécies de aves e mamíferos (SHIVAJI & PRASAD, 2009). Nos últimos anos, vários estudos sobre bactérias, protistas, algas e fungos têm sido conduzidos nesse ambiente (DEL FRATE & CARETTA 1990; VAN TRAPPEN *et al.*, 2005; BECQUEVORT *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2009, 2010; LOQUE *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Os microrganismos capazes de crescer em ambientes extremos atuam nos ciclos biogeoquímicos, e são frequentemente estudados pelo papel ecológico e pelo potencial biotecnológico que possuem (KOGES *et al.*, 2006; DE GARCÍA *et al.*, 2007). Trabalhos recentes vêm mostrando que algumas espécies de fungos são capazes de crescer e se propagar em diferentes ambientes extremos tais como águas hipersalinas (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003), em superfícies de rochas úmidas (STEFLINGER, 1998), e em sedimentos marinhos profundos (LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2001). Em ambientes extremos tais como a Antártica, os microclimas são fundamentais para determinar a abundância e a distribuição destes microrganismos (AZMI & SEPPELT, 1997). Além disso, nos últimos anos, têm-se intensificado o estudo de fungos em associação com vegetais (musgos e gramíneas), macroalgas e águas do continente antártico (ADAMS *et al.*, 2006; VISHNIAC 2006; USPON *et al.*, 2009; LOQUE *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2009, 2010).

Os ambientes extremamente frios podem ser colonizados por um grupo de microrganismos denominados psicrófilos (VISHNIAC, 2006). Diferentes espécies de leveduras e fungos filamentosos psicrófilos e psicrotolerantes possuem a capacidade de colonizar estes ambientes, uma vez que, são hábeis em crescer entre temperaturas em 0 a 20°C (D'AMICO *et al.*, 2002). Entretanto, os mecanismos fisiológicos que conferem a tolerância a baixas temperaturas são complexos (ROBINSON, 2001). Os fungos adaptados a essas condições utilizam fontes de carbono complexas para o fornecimento de energia e são capazes de sintetizar enzimas extracelulares ativas a baixas temperaturas (ADAMS *et al.*, 2006; BRIZZIO *et al.*, 2007; DE GARCÍA *et al.*, 2007; VAZ *et al.*, 2011). Dessa forma, estes fungos

merecem considerável atenção não só pela importância na ciclagem de nutrientes e produção de biomassa nos ecossistemas frios, mas também pelo potencial biotecnológico (DEMING, 2002; FOGHT *et al.*, 2004; RASPOR & ZUPAN, 2006).

### 2.1.2 Lagos Antárticos

Os lagos antárticos abrigam comunidades microbianas distribuídas em ecossistemas de águas continentais e salinas (BRUNATI *et al.*, 2009). Em sua maioria são cobertos de gelo por no mínimo algumas semanas ao longo do ano, tendo esse fato uma influência decisiva sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas, tornando-os distintos das águas continentais de latitudes não polares. O gelo presente no lago controla a hidrodinâmica, o regime de luz, evita a turbulência causada pelo vento, reduz flutuações de temperatura, e é responsável pela formação de gradientes de salinidade durante o período de degelo. Isto ocorre por meio do próprio derretimento e, pela conseqüente entrada de água dos riachos de degelo, restringindo a troca gasosa com a atmosfera (COWAN & TOW, 2004; VINCENT, 1988). Nos lagos, onde os organismos estão protegidos contra as baixas temperaturas, reduzida umidade e ciclos de congelamento e descongelamento, a vida se estabelece de forma mais notável (WRIGHT & BURTON, 1981). Muitos lagos são cobertos por uma camada de gelo que mantém a água abaixo descongelada, a despeito das temperaturas negativas encontradas no inverno. Neste contexto, os lagos antárticos são ambientes favoráveis ao desenvolvimento de comunidades microbianas. As comunidades de fungos capazes de colonizar estes ambientes incluem principalmente espécies de fungos negros meristemáticos e leveduras basidiomicéticas (SELBMANN *et al.*, 2005; VISHNIAC 2006, BRANDÃO 2010).

Muitos dos lagos antárticos situam-se próximo ao mar e recebem influência dos aerossóis marinhos, ou são enriquecidos organicamente pela fauna local e pela erosão das rochas. O teor de sal dos lagos é originado pelo intemperismo químico das rochas como também do próprio ambiente marinho, tornando-os ambientes com composição iônica similar a da água do mar. Por outro lado, os lagos que não recebem influência marinha apresentam uma composição iônica semelhante a da água de degelo (COWAN & TOW, 2004).

Outros fatores importantes para as comunidades microbianas nos lagos são a temperatura e a estratificação química, as quais permitem a formação de gradientes

de nutrientes orgânicos e inorgânicos, criando nichos específicos ocupados por diferentes grupos de microrganismos. Durante o verão, o derretimento da cobertura de gelo periférica possibilita a entrada de água de riachos descongelados formando gradientes físico-químicos que resultam em nichos específicos, ocupados por diferentes organismos (COWAN & TOW, 2004).

Além desses fatores, a deposição de sedimento também se constitui em um dos principais reguladores da atividade microbiana nos lagos de alta latitude e o aprisionamento das partículas pelos filmes microbianos, principalmente os de cianobactérias, resultando em estruturas semelhantes aos estromatólitos (COWAN & TOW, 2004). De uma forma geral, os lagos antárticos são ricos em compostos orgânicos dissolvidos, quando comparados com os de latitude temperada. Desta forma, os principais processos microbianos que ocorrem nos lagos são a fotossíntese e a ciclagem de nutrientes (como fósforo, enxofre, carbono, ferro e manganês).

### **2.3 Diversidade de fungos em ecossistemas extremos**

Apesar dos fungos serem microrganismos facilmente dispersos e capazes de colonizar diferentes substratos, a abundância e diversidade diminuem ao longo do gradiente latitudinal que vai dos trópicos até a Antártica (ROSA *et al.*, 2009; BRANDÃO, 2010). A maioria dos microrganismos cultiváveis conhecidos ocupa nichos com temperaturas que não são consideradas extremas e estes são denominados de mesófilos (GOCHEVA *et al.*, 2009). Em relação aos microrganismos psicrófilos, pouco se sabe sobre a diversidade de seus habitats. Estes microrganismos são capazes de crescer em temperaturas próximas de 0°C ou negativas, e são comumente encontrados em regiões temperadas e polares (Ártico e Antártico), em terra, água (oceanos profundos) ou associados às espécies de plantas e animais de ambientes frios (SINGH *et al.*, 2006; STOKES & REDMOND, 1966). Estudos com microrganismos psicrófilos e psicrotolerantes mostraram que estes são responsáveis pela degradação de uma grande variedade de hidrocarbonetos, incluindo fenol e compostos relacionados com fenol e hidrocarbonetos do petróleo em solos alpinos europeus (MARGESIN 2009).



Leveduras, ao contrário de bactérias, são menos versáteis em relação à habilidade de se ajustar a diferentes temperaturas (SHIVAJI *et al.*, 2008). Shivaji e cols (2008) isolaram do solo do lago Roopkund, nas cordilheiras do Himalaia na Índia, uma nova levedura psicrófila produtora de protease, descrita como *Rhodotorula himalayensis*. A partir da caracterização da comunidade de leveduras em um ambiente aquático extremo, o sistema do Rio Agrio e o Lago Caviahue, no noroeste da Patagônia, foram obtidos 202 isolados de leveduras de amostras de água, dos quais os gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* representaram 98% do total de isolados obtidos (RUSSO *et al.*, 2006). De García e cols (2007) encontraram diversidade de leveduras em amostras de gelo e rios de origem glacial da Patagonia Argentina semelhantes aos resultados encontrados em estudos com amostras da Antártica e de geleiras alpinas. Os gêneros de leveduras encontrados obtidos de água de rios glaciais na Patagônia argentina foram: *Cryptococcus*, *Leucosporidiella*, *Dioszegia*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Mrakia*, *Sporobolomyces*, *Udeniomyces* e *Candida*.

A Antártica oferece uma grande variedade de condições climáticas extremas e por isso constitui um dos ambientes mais inóspitos do planeta (KOSTADINOVA *et al.*, 2009). No entanto, os microrganismos são capazes de se adaptar a diferentes ambientes extremos (KANSOH *et al.*, 2010). De acordo com Onofri *et al.* (2005), existe o registro de 1.604 fungos na península Antártica, pertencentes a 135 gêneros e 232 espécies.

Nas últimas décadas, as diferentes regiões da Antártica têm sido avaliadas quanto à presença de bactérias e arqueias psicrófilas, ocasionalmente de algas e mais raramente de fungos (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003). A diversidade de fungos em ambientes antárticos é relativamente baixa quando comparadas com águas de regiões tropicais e temperadas. Entretanto, uma variedade de espécies de fungos é encontrada nos ambientes antárticos e, frequentemente, novas espécies vêm sendo descritas (VISHNIAC, 2006). A frequente descrição de novas espécies e a baixa diversidade encontrada quando comparada com outras regiões se devem provavelmente aos poucos estudos micológicos e ao restrito número de habitats disponíveis para a vida microbiana nesse continente (RUISI *et al.*, 2007).

As diferenças na diversidade microbiana entre os ecossistemas antárticos, temperados e tropicais podem ser explicadas principalmente pelas condições encontradas na Antártica, como baixas temperaturas, baixa disponibilidade de água

líquida, estresse osmótico, dessecação, baixa disponibilidade de nutrientes, alta radiação UV e relativamente baixa insolação. Os microrganismos presentes na Antártica estão praticamente isolados geográfica e geneticamente e como consequência, adaptações fisiológicas e morfológicas específicas foram selecionadas para suportar as condições ambientais extremas. Por esta razão, há um crescente interesse no estudo da diversidade, ecologia, evolução, bem como no potencial biotecnológico da microbiota Antártica (ONOFRI *et al.*, 2005).

A maior parte dos fungos filamentosos e das leveduras descritas para Antártica é cosmopolita e psicrófila, mas alguns táxons são desconhecidos, o que sugere a presença de uma microbiota endêmica da região (BRUNATI *et al.*, 2009). O isolamento geográfico somado ao estresse ambiental que a comunidade fúngica está sujeita, proporcionam a realização de interessantes estudos sobre os microrganismos endêmicos (RUISI *et al.*, 2007). A maior parte dos fungos encontrados neste ecossistema são anamorfos, possuem ciclos de vida curto e reduzidos custos metabólicos associados à reprodução sexual. As espécies que parecem ser endêmicas, normalmente, são dependentes do material alóctone que entra na água proveniente dos ecossistemas que estão ao redor dos corpos d'água.

Espécies dos gêneros de leveduras *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Kondoa*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Mrakia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia*, *Sympodiomyces* e *Trichosporon* já foram encontradas em diferentes ecossistemas antárticos (SHIVAJI & PRASAD, 2009). Uma das espécies de levedura mais retratadas em estudos realizados no continente Antártico é *Cryptococcus victoriae* (VAZ *et al.*, 2011). *Cryptococcus vishniacii* é reconhecidamente uma levedura antártica psicrófila, capaz de crescer em temperatura abaixo -3°C (VISHNIAC, 2006). Algumas das hipóteses para a sobrevivência destas leveduras pode ser devido a sua capacidade de produzir proteínas do choque térmico e/ou acumular a trealose. A concentração diferenciada de ácidos graxos insaturados na membrana lipídica também é um mecanismo fisiológico encontrado nos fungos presentes nesse ecossistema (SHIVAJI & PRASAD, 2009). Além disso, um dos mecanismos ecológicos encontrados nos fungos deste ecossistema é a germinação anual de esporos durante os meses mais quentes (ROBINSON, 2001).

Novas espécies de fungos vêm sendo descritas a partir de amostras coletadas na Antártica, as quais são consideradas endêmicas para este

ecossistema. Algumas espécies de fungos isoladas de lagos são adaptadas a viver em intestino de aves, e alternam períodos de termotolerância e psicotolerância durante o ciclo de vida (DE HOOG, 2005). De acordo com De Hoog (2005), *Thelebolus* é frequentemente isolado do Ártico e da Antártica, sendo *T. microsporus* mais frequente de amostras de lagos antárticos.

Por meio do cultivo seletivo para isolamento de fungos do ambiente antártico, Gunde-Cimerman e cols (2003) encontraram táxons pertencentes ao grupo de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas, fungos melanizados, principalmente dos gêneros *Cladosporium* e *Aureobasidium*, além de diferentes espécies do gênero *Penicillium*. A partir de amostras de solo da Antártica, Singh e cols (2006) isolaram fungos pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, por meio de cultivo em meio sólido e incubação a temperaturas que variaram entre 2 e 5°C por até 45 dias. Dentre os fungos filamentosos, os mais frequentemente isolados pertencem aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cadaphora*, *Chaetomium*, *Cladosporium* (principalmente *C. cladosporioides* e *C. herbarum*), *Geomyces* (com predominância de *G. pannorum*), *Phialophora* (principalmente *P. fastigiata*), *Phoma*, *Thelebolus* (*T. microsporus*), *Mortierella* (*M. antarctica*), *Solenopezia* e *Thielavia* (ADAMS *et al.*, 2006, BLANCHETT *et al.*, 2010).

Diante do exposto acima, é possível inferir que as perspectivas com pesquisas relacionadas à extremófilos são bastante promissoras, devido ao potencial econômico destes microrganismos e ao importante papel que desenvolvem nos processos biogeoquímicos (OARGA, 2009). Sendo assim, o conhecimento da diversidade de fungos presentes no ecossistema Antártico é de extrema relevância, pois estes microrganismos podem ser fontes de novos metabolitos, com aplicações biotecnológicas.

## **2.4 Bioprospecção de fungos em ecossistemas extremos**

Os produtos naturais (metabólitos secundários) são elementos de grande importância quanta diversidade molecular e funcionalidade biológica, características indispensáveis para o descobrimento de fármacos úteis para a humanidade. Para Bérdy (2005), os produtos naturais incluindo os metabólitos microbianos podem ser utilizados de três maneiras diferentes:

(a) aplicados de forma direta na medicina, na agricultura ou em outros campos;

(b) utilizados como matéria-prima para re-estruturações químicas ou microbiológicas;

(c) utilizados como protótipos para a síntese química de metabólitos análogos ou modelos para o desenvolvimento de drogas.

Os produtos naturais são caracterizados por serem moléculas de baixo peso molecular e, de estruturas químicas bem diversificadas (BÉRDY, 2005). São moléculas como alcalóides, terpenóides e poliacetilenos que a princípio são “dispensáveis” para a sobrevivência e ao desenvolvimento do microrganismo. Os produtos naturais são vistos como moléculas bioativas que atuam melhor do que substâncias totalmente sintéticas, o que os tornam bons candidatos a protótipos para o desenvolvimento de novas drogas (CHIN, 2006).

Os microrganismos, especialmente os fungos, apresentam a capacidade de produzir diferentes metabólitos secundários e, por esse motivo, representam a base para desenvolvimento de diferentes substâncias de interesse na medicina, na indústria e na agricultura. De acordo com Bérdy (2005), o total de metabólitos fúngicos bioativos é de aproximadamente 8.600, o que representa cerca de 38% de todos os produtos microbianos descritos. Aqueles metabólitos produzidos por fungos filamentosos (principalmente ascomicetos e fungos anamorfos) representam aproximadamente 6.400 do total conhecido. Diante do exposto acima e ao fato de que seis dos 20 medicamentos mais comumente prescritos são de origem fúngica, e que somente cerca de 5% dos fungos foram descritos, o reino Fungi oferece um enorme potencial para a descoberta de novos fármacos (SCHULZ & BOYLE, 2005).

Nos últimos anos tem crescido o interesse na diversidade e biotecnologia de microrganismos extremófilos, os quais são conhecidos por produzir enzimas e metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico (SINGH *et al.*, 2006). Além disso, muitos microrganismos extremófilos podem não ser cultiváveis pelas técnicas convencionais de laboratório (WILSON & BRIMBLE 2009), e por isso podem ser subestimados como fontes de metabólitos bioativos. Apesar dos microrganismos extremófilos serem considerados uma potencial fonte de novos metabólitos secundários e encontrados em grande diversidade na natureza, poucos desses microrganismos têm sido selecionados como alvos para produção e obtenção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico.

A habilidade de crescimento dos microrganismos a baixas temperaturas requer muitas adaptações para manter as taxas metabólicas e sustentar o crescimento compatível aos ambientes frios (GOCHEVA *et al.*, 2009). O crescimento em baixas temperaturas na Antártica sugere que os fungos são capazes de degradar compostos orgânicos a estas temperaturas, contribuindo para a ciclagem de nutrientes neste ambiente (THOMAS-HALL *et al.*, 2002; AMATO *et al.*, 2009). A partir desse contexto, diferentes produtos naturais obtidos de microrganismos psicrófilos e psicrotolerantes presentes em fontes de águas frias tem sido descritos (LEBAR *et al.*, 2007).

Para que os organismos se desenvolvam em condições extremas de pH, temperatura, exposição à radiação UV, salinidade e pressão, adaptações únicas como a biossíntese de novas moléculas que vão desde simples lipídios a complexos metabólitos secundários, estão presentes nestes microrganismos (WILSON & BRIMBLE 2009). Os fungos adaptados às condições extremas são frequentemente investigados pela capacidade de produção de fotoprotetores (micosporinas e pigmentos), antioxidantes e enzimas ativas a baixas temperaturas (RAY *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 2000; LIBKIND *et al.*, 2005; DE GARCÍA *et al.*, 2007; VAZ *et al.*, 2011). Duas micosporinas, micosporina glicosídeo-glutaminol e micosporina glicosídeo-glutaminol e três metabólitos não identificados que absorvem luz ultravioleta foram obtidos de fungos isolados de águas hipersalinas e gelo polar glacial (KOGÉJ *et al.*, 2006). A micosporina glicosídeo-glutaminol age como um soluto complementar em algumas leveduras negras extremófilas expostas a condições salinas de crescimento, auxiliando-as a suportar o estresse osmótico. Segundo Margesin e cols (2007), foram descritas três novas espécies de leveduras de ambientes frios (*Rhodotorula glacialis*, *Rh. psychrophila* e *Rh. psychrophenolica*) capazes de degradar fenol. Oito leveduras adaptadas ao frio e produtoras de poligacturonase, isoladas de amostras congeladas, foram identificadas como *Cystofilobasidium lari-marini*, *C. capitatum*, *Cryptococcus macerans* e *Cr. aquaticus* (BIRGISSON *et al.*, 2003). As leveduras produzem grandes quantidades de enzimas e podem ser alternativas interessantes como fontes de pectinases, utilizadas principalmente na indústria alimentícia.

A partir de estudos de bioprospecção e do uso de metabólitos secundários como marcadores químicos, Dalsgaard e cols (2004) isolaram dois novos metabólitos, psicrofilina A e cicloaspeptídeo D, bem como a substância conhecida

cicloaspeptídeo A, a partir da espécie psicrotolerante *Penicillium ribium* (IBT16531). Anteriormente, os cicloaspeptídeos haviam sido obtidos somente a partir de uma espécie do gênero *Aspergillus* (KOBAYASHI *et al.*, 1987). Posteriormente, outras moléculas da mesma série foram isoladas, psicofilina B e C, a partir de outro novo fungo psicrotolerante *Penicillium rivulum* (DALSGAARD *et al.*, 2005). Segundo os mesmos autores, o fungo *P. algidum*, encontrado no solo da Groelândia, produziu um novo metabólito denominado psicofilina D, o qual exibe moderada atividade citotóxica sobre linhagens de células leucêmicas P388 de camundongos. Zhang e cols (2009) isolaram do extrato bruto do fungo *Isaria farinosa* além de substâncias conhecidas, os cicloaspeptídeos F e G. Essas substâncias apresentam atividade citotóxica contra células Hela e linhagens de células tumorais de mama MCF-7.

Kansoh e cols (2010) obtiveram espécies de fungos halofílicos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Scopulariopsis* de amostras de sedimento e água do mar Mediterrâneo, os quais foram capazes de produzir metabólitos antimicrobianos. Posteriormente, do extrato do fungo *Penicillium viridicatum* foi isolado a fumigaclavina, a qual apresentou atividade antimicrobiana sobre diferentes espécies de bactérias (*Bacillus cereus* e *B. subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), leveduras (*Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*) e fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Botrytes alli*, *Deplodia* sp., *Fusarium oxysporium* e *Helminthosporium turcicum*).

Brunati e cols (2009) caracterizaram duas moléculas a partir do extrato fúngico de *Penicillium chrysogenum*, obtido de sedimento do lago Highway, na Antártica. O extrato apresentou atividade contra *S. aureus*, *Enterococcus faecium* e *E. coli*. As substâncias identificadas foram bis-antraquinonas, duas micotoxinas conhecidas como rugulosina e “skyrin”, que possuem atividade antimicrobiana, antiviral e antisetíca. Além desses metabólitos, duas espécies de *Aspergillus* (*A. clavatus* e *A. niger*) apresentaram também extratos potencialmente promissores com atividade antibacteriana sobre (*S. aureus*, *E. faecium* e *E. coli*), antifúngica (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*) e citotóxica (contra linhagens de células de câncer de colo de útero humano). O fracionamento dos componentes ativos indicou possíveis novas substâncias ainda não descritas (BRUNATI *et al.*, 2009).

A partir do exposto acima, torna-se claro a necessidade de estudos que visem conhecer a riqueza de espécies de fungos presentes em lagos antárticos, os quais

podem representar uma fonte promissora de fungos extremófilos, capazes de produzir metabólitos bioativos. Esses metabólitos podem ser utilizados como moléculas protótipos para o desenvolvimento de novas drogas e em processos biotecnológicos.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade de fungos filamentosos presentes em lagos antárticos e verificar a produção por estes microrganismos e por leveduras de substâncias com atividade antifúngica, citotóxica e antiparasitária.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar e cultivar fungos presentes em lagos antárticos;
- Contribuir para montagem de uma coleção de cultura de microrganismos antárticos;
- Identificar os fungos filamentosos obtidos utilizando características morfológicas e moleculares;
- Caracterizar a diversidade da comunidade de fungos filamentosos presentes nos lagos amostrados;
- Cultivar e preparar extratos dos fungos filamentosos e de leveduras obtidos dos mesmos lagos por meio de Fermentação no Estado Sólido (FES);
- Caracterizar a capacidade dos fungos filamentosos e das leveduras obtidos de produzirem metabólitos com atividades antifúngica, antitumoral e antiparasitária por meio dos ensaios:
  - Sobre três linhagens de *Candida albicans* e uma amostra clínica de *Paracoccidioides brasiliensis* de interesse clínico,
  - Duas linhagens de células tumorais humanas preditivas da atividade anticâncer,
  - Formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.



## 4. Metodologia

### 4.1 Locais e procedimentos de coleta

Os pontos de amostragem foram situados no Arquipélago Shetland do Sul, na Península Antártica. Os lagos amostrados estão localizados na Baía do Almirantado (Ilha Rei *George*) e na Ilha *Deception*. As coletas foram realizadas nos meses de dezembro de 2008 e janeiro de 2009, em lagos formados por água de degelo e por água de degelo/ água do mar.

A Ilha Rei *George*, entre as sete ilhas existentes no arquipélago Shetland do Sul, é uma das mais extensas com cerca de menos de 10% dos seus 1295 Km<sup>2</sup> livres de gelo. A Baía do Almirantado (62°09'S, 58°28'W) constitui a maior baía da Ilha Rei *George*, com uma área aproximada de 131 Km<sup>2</sup>. Possui um clima determinado por passagem de sistemas ciclônicos, responsáveis por transportar ar aquecido e úmido, fortes ventos e grandes volumes de precipitação. Apresenta médias mensais que variam entre 0°C a temperaturas negativas, principalmente nos meses de inverno. Essas características determinam um clima oceânico frio e úmido. Na Baía do Almirantado, dois lagos formados por água de degelo foram amostrados: um interno a Ponta Stenhouse e outro próximo ao Refúgio Brasileiro II; e três lagos formados por água de degelo e água do mar: próximo a Estação Antártica Peruana Macchu Picchu, ponta Agat e próximo ao glacial Wanda (Figura 1).

A Ilha *Deception* (62°57'S, 60°38'W) (Figura 2) é considerada o local com maior atividade vulcânica na Antártica (LLAMES & VINOCUR 2007). As temperaturas variam entre 11 a -28°C, enquanto a temperatura média anual é de -3°C. Além disso, os ventos predominantes do nordeste e oeste e a média anual de precipitação de 500 mm condicionam um clima polar marítimo (<http://www.deceptionisland.aq/climate.php>). Na Ilha *Deception*, o lago amostrado foi o *Crater Lake*, formado apenas por água de degelo. No presente trabalho, os lagos antárticos amostrados foram designados como:

- Stenhouse (Lago interno a ponta Stenhouse)
- Refúgio II (lago próximo ao Refúgio Brasileiro II)
- Macchu Picchu (lago próximo a Estação Antártica Peruana Macchu Picchu)

- Agat (lago próximo à ponta Agat)
- Wanda (lago próximo ao glacial Wanda)
- *Crater Lake*



Figura 1: Mapa da Baía do Almirantado, na Ilha Rei George, Península Antártica mostrando os locais dos lagos em que as amostras foram coletadas: Sh = Stenhouse (62°04'221"S, 58°22'228"W), Rf = Refúgio II (62°04'088"S, 58°25'055"W), Mp = Macchu Picchu (62°05'S, 58°19'W), Ag = Agat (62°11'892"S, 58°26'484"W) e Wd = Wanda (62°04'762"S, 58°19'505"W) (SIMÕES *et al.*, 2004 com modificações).



Figura 2: Mapa topográfico da Ilha Deception, Península Antártica, indicando o lago Crater Lake.

Para cada lago foram obtidos *in situ* os parâmetros físico-químicos de temperatura, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, potencial de óxido redução e teor de clorofila por meio da sonda Multiparâmetros YSI 650. As amostras foram coletadas em três pontos situados na região litorânea de cada lago e a água foi colhida da superfície (~30-50 cm). Em

cada ponto foram obtidas cinco repetições. As coletas foram efetuadas utilizando embalagens estéreis (Real Pack) e abertas na margem dos lagos para coletar amostras de água em cada ponto. As amostras coletadas foram transferidas para frascos esterilizados e mantidas sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento do uso, no Laboratório de Química/Microbiologia da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF).

#### **4.2 Isolamento, cultivo e preservação de leveduras e fungos filamentosos**

As amostras coletadas foram mantidas refrigeradas e trabalhadas na EACF em até 24 horas após a coleta. Para o isolamento dos fungos filamentosos e das leveduras, amostras de água foram filtradas através de membranas de nitrocelulose previamente esterilizadas (porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 47mm), utilizando um aparato de filtração Nalgene®, com auxílio de uma bomba a vácuo. Os volumes coletados e filtrados variaram de 175 mL a 400 mL. As membranas foram inoculadas na superfície de placas de Petri contendo meio ágar extrato de malte-extrato de levedura – YM (peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0%, extrato de malte 0,3%, ágar 2,0%), contendo 200 mg/L de cloranfenicol para inibição de bactérias. As placas foram incubadas por até 20 dias a 15°C. Transcorrido o período de incubação, as colônias presentes nas placas foram descritas com base na coloração, textura, forma e tamanho, e registradas com os dados de procedência (local e data de coleta).

Para a purificação dos isolados de fungos filamentosos, os diferentes morfotipos foram cultivados em placas de Petri contendo agar dextrose batata (BDA). Esse meio de cultura é bastante usado para a caracterização macromorfológica de fungos filamentosos. As leveduras foram isoladas, cultivadas e identificadas por Luciana R. Brandão (Brandão, 2010). Todos os isolados foram agrupados de acordo com as características macro morfológicas, catalogados e preservados para posterior identificação. Os fungos foram armazenados em água destilada esterilizada (CASTELANI, 1967), e em glicerol 30% a -80°C. Todos os isolados obtidos foram armazenados na Coleção de Cultura do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### 4.3 Identificação dos fungos

A identificação dos isolados de fungos filamentosos foi baseada inicialmente nas características morfológicas. Contudo, grande parte dos fungos filamentosos não produz conídios ou esporos assexuados (base para a identificação morfológica) quando crescidos em meios de culturas micológicas convencionais (WIYAKRUTTA *et al.*, 2004). Estes isolados foram, portanto, identificados por meio do sequenciamento da região transcrita interna ITS1-5.8S-ITS2 do gene do RNA ribossomal.

#### 4.3.1 Extração do DNA total

A extração do DNA total foi feita de acordo com ROSA *et al.* (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em ágar BDA. Pequenos fragmentos de micélio, de aproximadamente 50 cm<sup>2</sup>, foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescido de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – dodecil sulfato de sódio 1%) e deixados a -20°C por aproximadamente 10 min. O micélio foi triturado com o auxílio de um pistilo e foram acrescidos 5 µL de Proteinase K (50µg/mL). Após homogeneização, o tubo foi deixado por 30 min a 60° C em banho-maria. Após essa etapa, foram adicionados 162 µL de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 10 min a 65°C. A seguir, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL onde foi acrescentado 10% do volume de acetato de sódio 3M. Após homogeneização, o tubo foi incubado a 0°C por 30 minutos e uma nova centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos foi realizada. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 50% do volume de isopropanol. Foi realizada uma centrifugação a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200µL de etanol 70% frio e com o auxílio de uma pipeta, a suspensão foi gentilmente

homogeneizada. A amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. Novamente foram adicionados 200µL de etanol 70% frio, a suspensão foi homogeneizada, centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. Após o tubo secar por aproximadamente 15 minutos, foram adicionados 100 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) seguido por incubação a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20° C.

#### **4.3.2 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4**

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região ITS do gene do rRNA, conforme descrito por WHITE *et al.* (1990). A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas, EUA), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Fermentas, EUA), 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 a 10 pmol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas, EUA), 1 a 5 µL do DNA e 50 µL q.s.p. de água deionizada autoclavada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55°C, 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. Os géis foram corados com uma solução de agente intercalante Gelred<sup>TM</sup> (Biotium, EUA) a 0,2%, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### **4.3.3 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento**

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados por meio da técnica com Polietilenoglicol (PEG). Ao produto de PCR foi adicionado igual volume de uma solução de Polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M e deixado em banho-maria à 37° C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.500 rpm por 15 minutos e o

sobrenadante retirado e descartado. A seguir, foram adicionados 125  $\mu\text{L}$  de etanol 70-80% gelado, o tubo centrifugado a 13.500 rpm por dois minutos e o etanol retirado. Uma nova centrifugação a 13.200 rpm por um segundo foi realizada (“spin down”) e o tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de água e o conteúdo do tubo foi homogeneizado em “vortex” por 15 segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

O produto da PCR obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). As reações de seqüenciamento foram realizadas usando o DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000.

A reação de seqüenciamento foi feita com um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , em que foram colocados: 1  $\mu\text{L}$  do iniciador a ( $5 \mu\text{mol}^{-1}$ ), 4  $\mu\text{L}$  de pré-mix (presente no kit de sequenciamento), DNA e o restante de água deionizada estéril para completar o volume. A concentração do DNA variou entre 80 e 120 ng. O programa de ciclagem utilizado foi de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95 °C por 25 segundos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50 °C e 3 minutos de extensão a 60 °C. Após a reação, os produtos do sequenciamento foram transferidos para microplacas de 96 poços para posterior precipitação e leitura.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 7,5 M e 28  $\mu\text{L}$  de etanol 96% (Merck) refrigerado, em cada poço. A placa foi então incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 4.000 r.p.m a 4 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Foi acrescentado 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (Merck) refrigerado e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 4.000 r.p.m a 4 °C. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado por inversão e o DNA de cada poço foi hidratado com 10  $\mu\text{L}$  de *Loading buffer* (presente no kit de seqüenciamento). A placa foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos, centrifugada por 1 segundo a 900 r.p.m. e armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACE™ 1000.

#### **4.3.4 Análise computacional das sequências**

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de culturas tipo de fungos conhecidos depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biotechnology. Os fungos que apresentaram as sequências analisadas com identidade  $\geq 98\%$  em relação às sequências de fungos já depositadas no GenBank foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero; já aqueles que apresentaram sequências com identidade de 93% a 97% foram considerados como pertencentes ao mesmo gênero; e para sequências com identidade  $< 93\%$ , os isolados foram identificados como espécies desconhecidas ou identificados em família, classe ou, ordem (ROSA *et al.*, 2010). As sequências dos táxons referentes à classe, ordem, família, gênero ou outros níveis hierárquicos foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas por meio do alinhamento dos fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA, utilizando-se as sequências que possuíam acima de 350 nucleotídeos. Os isolados que apresentaram sequências abaixo de 350 nucleotídeos foram considerados como não identificados no presente trabalho, e não foram utilizados na construção das árvores filogenéticas. A análise filogenética foi conduzida utilizando-se o programa Mega Molecular (*Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007). A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo de Neighbor-joining. O modelo *Maximum composite likelihood* foi usado para estimar a distância evolucionária. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1.000 repetições utilizando os programas incluídos no Mega 4.

#### **4.4 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e equitabilidade**

As contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) foram usadas para cálculo das densidades (UFC/L) em cada lago amostrado. Além disso, foi calculada a porcentagem de abundância de cada táxon. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência de cada táxon em comparação com o total de táxons presente nas comunidades fúngicas de cada lago.



Para avaliar a diversidade de espécies fúngicas presentes nos diferentes lagos amostrados, foram utilizados os índices de riqueza e equitabilidade de: (i) Shannon  $H = -\sum ni/n \ln (ni/n)$  e (ii) Simpson's  $= \sum (ni/n)^2$ , respectivamente, onde  $ni$  é o número de indivíduos do táxon  $i$  e  $n$  é o número total de indivíduos. Para avaliar a similaridade entre as comunidades fúngicas de cada lago utilizou-se o índice de Bray-Curtis ( $B$ ) e o coeficiente de Sorensen ( $QS$ ). O índice de Bray-Curtis ( $B$ ) varia de 0 a 1, sendo que 0 significa que as comunidades não compartilham nenhuma espécie e 1 que compartilham todas as espécies na mesma frequência. O coeficiente de Sorensen ( $QS$ ) é representado pela fórmula:  $QS = 2C/(A+B)$ , onde  $A$  e  $B$  representam o número de espécies nas amostras  $A$  e  $B$ , respectivamente, e  $C$  o número de espécies compartilhadas pelas duas amostras. Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (RYAN *et al.* 1995).

## **4.5 Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos brutos**

### **4.5.1 Fungos filamentosos**

Para o cultivo de fungos filamentosos, discos de aproximadamente 5 mm de crescimento fúngico de cada isolado foram inoculados em duas placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Himedia, Índia). As placas foram incubadas a 15°C, com umidade de 70-80%, durante 15 dias. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura e a biomassa fúngica foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL, contendo metanol P.A. para extração dos metabólitos secundários. Estes foram macerados com o auxílio de um bastão de vidro. Os tubos foram incubados a 10°C e após 48 horas, o sobrenadante foi transferido para frascos de cintilação e seco em centrífuga a vácuo (Savant) com temperatura inferior a 35°C.

### **4.5.2 Leveduras**

As leveduras (92) isoladas por Brandão (2010) foram utilizadas para a produção de extratos brutos no presente trabalho. Estas foram cultivadas em tubos

contendo caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%) e incubadas a 15 °C até o crescimento. Após o crescimento, 20 µL do caldo GYMP com as leveduras foram inoculados em microplacas de 24 poços contendo meio ágar Sabouraud (glicose 2,0%, peptona 1,0%, extrato de levedura 0,5%, agar 2,0%). Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento das leveduras foi macerado com o auxílio de palitos de madeira previamente esterilizados e acrescentados 1,5 mL de metanol P.A., para extração dos metabólitos secundários. As placas de 24 poços foram então incubadas a 10°C e após 48 horas, o sobrenadante foi filtrado e transferido para frascos de 1,5 mL e secos em centrífuga a vácuo (Savant) com temperatura inferior a 35 °C.

De cada extrato obtido de levedura ou fungos filamentosos, foi preparada uma solução estoque em sulfóxido de dimetila (DMSO) a uma concentração de 100 mg/mL e mantidos a -70° C até a realização dos ensaios antifúngicos.

Todos os extratos produzidos também foram depositados a 20 mg/mL em sulfóxido de dimetila (DMSO) a -20 °C na extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais/IRR-FIOCRUZ, para posterior realização dos ensaios antitumorais e antiparasitário.

## **4.6 Ensaios Biológicos**

### **4.6.1 Determinação da atividade antifúngica**

A determinação da atividade antifúngica dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em placa de acordo com metodologia descrita no Documento 7.1 *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFTS-EUCAST 2002), com modificações. Três linhagens de *Candida albicans* foram utilizadas: a linhagem ATCC 18804 e duas linhagens previamente isoladas por Gabler (2008), 2.1A e 15.3C. A linhagem 15.3C foi isolada de um paciente aidético com presença de candidose oral e contagens de células CD4 abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> (GABLER *et al.*, 2008). Já a linhagem 2.1A foi isolada de um paciente com tuberculose e com presença de candidose oral (Gabler 2008); e a linhagem ATCC 18804 foi isolada da lesão de um paciente com micose interdigital

(<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=18804&Template=fungiYeast>). Uma amostra clínica de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18), cedida pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, também foi utilizada nos ensaios antifúngicos.

#### **4.6.2 Padronização dos inóculos**

Os isolados de *C. albicans* foram crescidos em ágar Sabouraud (Difco/EUA) a 30° C por 24 horas. Cinco colônias distintas com diâmetro de aproximadamente 1 mm foram suspensas em solução salina [NaCl 0,85% (0,145mol/L)] esterilizada. A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos, a densidade celular padronizada por meio da escala de Mac Farland nº 0,5 em densidade óptica, o que corresponde a 10<sup>6</sup> UFC/mL, acrescentando-se, quando necessário, solução salina esterilizada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm o que equivale a 80% de transmitância (AFTS-EUCAST 2002). Posteriormente a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em meio de cultura (RPMI 1640 acrescido de 2% de glicose) para utilização no ensaio.

O isolado *P. brasiliensis* Pb18 foi mantido por meio de sucessivas passagens em meio de cultura YPD (peptona de caseína 0,5%, extrato de levedura 0,5%, glicose 1,5% e ágar 1,5%), incubados a 37° C. Após 7 a 10 dias de crescimento; uma alçada contendo células fúngicas foi ressuspensa em 5 mL de salina esterilizada. Após cinco minutos, o sobrenadante foi coletado e a transmitância a 530 nm foi ajustada para 70%. Posteriormente a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em meio de cultura (RPMI 1640) para utilização no ensaio.

#### **4.6.3 Ensaio antifúngico**

Para a realização dos ensaios antifúngicos foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (TPP/Suíça). Todos os testes foram realizados em duplicata e os 96 poços divididos como mostrado na Figura 3. Para as três linhagens de *C. albicans* utilizou-se o meio de cultura sintético RPMI 1640 (INLAB Diagnostica) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (Sigma/EUA), suplementado com 2% glicose. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico

anfotericina B (Sigma/EUA). Em cada poço usado para teste foi inoculado 25 µL de cada extrato dissolvido em DMSO e água deionizada esterilizada, 25 µL de RPMI 1640 e 50 µL de inóculo. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µL, e as concentrações de DMSO de 0,25%; a droga controle de 2 µg/mL; e os extratos de 250 µg/mL. Para a realização do ensaio antifúngico com o isolado *P. brasiliensis* Pb 18, utilizou-se o meio de cultura sintético RPMI 1640 tamponado com (MOPS). Como controle positivo foi utilizado o antifúngico itraconazol. Em cada poço usado para teste foi inoculado 50 µL de cada extrato dissolvido em DMSO e água deionizada esterilizada, 50 µL de RPMI 1640 e 100 µL de inóculo. Ao final, o volume de cada poço foi de 200 µL, e as concentrações de DMSO de 0,25%, da droga controle de 2 µg/mL e do extrato de 250 µg/mL.

As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas e 37°C por 10 dias, para *C. albicans* e *P. brasiliensis*, respectivamente. Após incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de brometo tiazolil azul de tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), o conteúdo homogeneizado e as placas novamente incubadas a mesma temperatura de crescimento dos respectivos inóculos por 4 horas. Nas mitocôndrias das células alvos, o MTT é metabolizado em formazan, revelando a presença de células metabolicamente ativas. Após o metabolismo do MTT, foram adicionados 100 µL/poço de SDS/isopropanol (5%), que rompe a membrana celular dos microrganismos alvos e disponibiliza no meio o formazan. Nas placas teste contendo o *P. brasiliensis* Pb18, antes de acrescentar a solução de dodecil sulfato de sódio e álcool isopropílico, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, de forma que as células fúngicas ainda permanecessem no fundo dos poços.

A leitura foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), com a absorvância de 570 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do poço controle contendo apenas o microrganismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de Inibição: } \frac{\text{Densidade óptica poço controle} - \text{DO poço tratado}}{\text{Densidade óptica do poço controle}} \times 100$$

Arbitrariamente, foram considerados promissores os extratos com valor de inibição igual ou maior que 70%; medianamente promissores aqueles que

apresentaram valor de inibição entre 50 e 69%; e não promissores aqueles que apresentaram valor de inibição inferior a 50%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	EX1	EX9	EX17	EX25	EX33	EX41	EX49	EX57	EX65	EX73	DMSO
B	BL	EX2	EX10	EX18	EX26	EX34	EX42	EX50	EX58	EX66	EX74	DMSO
C	BL	EX3	EX11	EX19	EX27	EX35	EX43	EX51	EX59	EX67	EX75	DMSO
D	BL	EX4	EX12	EX20	EX28	EX36	EX44	EX52	EX60	EX68	EX76	DMSO
E	CN	EX5	EX13	EX21	EX29	EX37	EX45	EX53	EX61	EX69	EX77	CP
F	CN	EX6	EX14	EX22	EX30	EX38	EX46	EX54	EX62	EX70	EX78	CP
G	CN	EX7	EX15	EX23	EX31	EX39	EX47	EX55	EX63	EX71	EX79	CP
H	CN	EX8	EX16	EX24	EX32	EX40	EX48	EX56	EX64	EX72	EX80	CP

**BL** – Branco (RPMI 1640 + 2% glicose)  
**CN** – Controle Negativo (RPMI 1640 + inóculo)  
**EX** - Extrato

**DMSO** – Controle de DMSO 0,25%  
(RPMI 1640/ DMSO + inóculo)  
**CP** – Controle Positivo  
(RPMI 1640/Anfotericina B + inóculo)

Figura 3: Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios antifúngicos.

#### 4.6.4 Ensaios com células tumorais humanas

A manutenção, o cultivo celular e os ensaios de toxicidade com células tumorais foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) por técnicos especializados.

O efeito dos extratos sobre a proliferação celular foi avaliado utilizando as linhagens tumorais MCF-7 (mama) e TK-10 (renal), que de acordo com dados do NCI (*National Cancer Institute*) são capazes de detectar 95% dos extratos que contém substâncias antitumorais. De forma breve, as suspensões celulares foram diluídas de modo que 100 µL, adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços continha: 10.000 células MCF-7 ou 15.000 células TK-10. Os inóculos foram incubados por 24 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para estabilização. Em cada poço foi adicionado o extrato fúngico na concentração final de 20 µg/mL. As células foram incubadas na presença dos extratos por 48 horas, a 37 °C, em

atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. A multiplicação destas células foi medida pelo método colorimétrico, empregando-se a sulfarrodamina B. Este corante se liga aos aminoácidos básicos das proteínas das células e pode ser utilizado para quantificar a proliferação celular. Os extratos capazes de inibir a multiplicação celular em pelo menos 60% foram selecionados como ativos. Os testes foram realizados em triplicatas e com controle positivo representado pela droga citotóxica etoposídeo (8 µg/mL Sigma, EUA).

#### **4.6.5 Ensaios in vitro com a forma amastigota-like de *Leishmania (L.) amazonensis***

Culturas axênicas da forma amastigota-like de *L.(L.) amazonensis*, previamente caracterizadas por meio de eletroforese de isoenzimas e depositadas na Coleção de *Leishmania* do Centro de Referência em Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, foram utilizadas para o ensaio adotando-se o protocolo proposto por CALLAHAN *et al.* (1997) com algumas modificações. As formas amastigotas foram semeadas na concentração de 10<sup>8</sup> parasitos/mL e deixadas em meio apropriado, na presença ou não dos extratos e drogas controle. Após 72 horas de incubação, a atividade dos extratos sobre as formas amastigotas nos poços teste foi medida pelo método colorimétrico do MTT (Sigma/USA). A absorbância dos poços testes foi comparada com as absorbâncias dos controles com e sem drogas de referência (Anfotericina B). Foram considerados ativos os extratos capazes de inibir acima de 70% a proliferação dos parasitas.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Coleta e isolamento dos fungos

Noventa amostras de água foram obtidas dos seis lagos amostrados (15 amostras por lago). De cada lago foram coletados aproximadamente seis litros de água, que foram utilizados para o isolamento dos fungos (cerca de 2 L por ponto).

Ao final do processo de isolamento foram obtidos 128 isolados de fungos; destes, 33 (26%) foram isolados das amostras de água do lago Stenhouse. O lago Agat apresentou o menor número de isolados fúngicos [13 isolados (10%)] (Figura 4). Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de caracterizar a comunidade de fungos presentes nos ecossistemas terrestres da Antártica (DEL FRATE & CARETTA 1990; ADAMS *et al.*, 2006; ARENZ *et al.*, 2006; CONNELL *et al.*, 2006; KOSTADINOVA *et al.*, 2009). No entanto, poucos trabalhos têm sido conduzidos a partir de amostras de água dos lagos antárticos para caracterização da comunidade fúngica (ELLIS-EVANS 1996). Ellis-Evans (1985) estudou a diversidade da comunidade fúngica, a partir de amostras de sedimento e de água (500 mL) coletadas nas margens de cinco lagos da Antártica (~10-20 cm de profundidade). O autor isolou leveduras basidiomicéticas e fungos filamentosos utilizando placas contendo ágar Sabouraud e ágar extrato de malte-extrato de levedura, incubadas a 1-4°C. Brunati e cols (2009), estudando fungos presentes em sedimento de lagos da Antártica, obtiveram 160 isolados de fungos filamentosos. No entanto, neste trabalho, os autores isolaram fungos utilizando a técnica de *pour plate*, em que as amostras de sedimento foram plaqueadas (com ou sem enriquecimento prévio em meio de cultura líquido) em quatro meios de cultura diferentes e as placas incubadas a 4, 10 e 20°C, por 15 dias. No presente estudo, o agar YM foi utilizado para isolamento dos fungos por ser um dos meios de culturas mais tradicionais no isolamento de fungos e leveduras (ROSA & PETER, 2006). A quantidade de isolados fúngicos obtidos no presente trabalho está próxima dos estudos realizados até o momento (ELLIS-EVANS, 1985; BRUNATI *et al.*, 2009). Entretanto, a incubação das placas em diferentes temperaturas poderia proporcionar o isolamento de um número maior de isolados e/ou de fungos diferentes. No entanto, devido a algumas restrições de

logística, durante o processamento das amostras, a temperatura de incubação foi de 15°C.

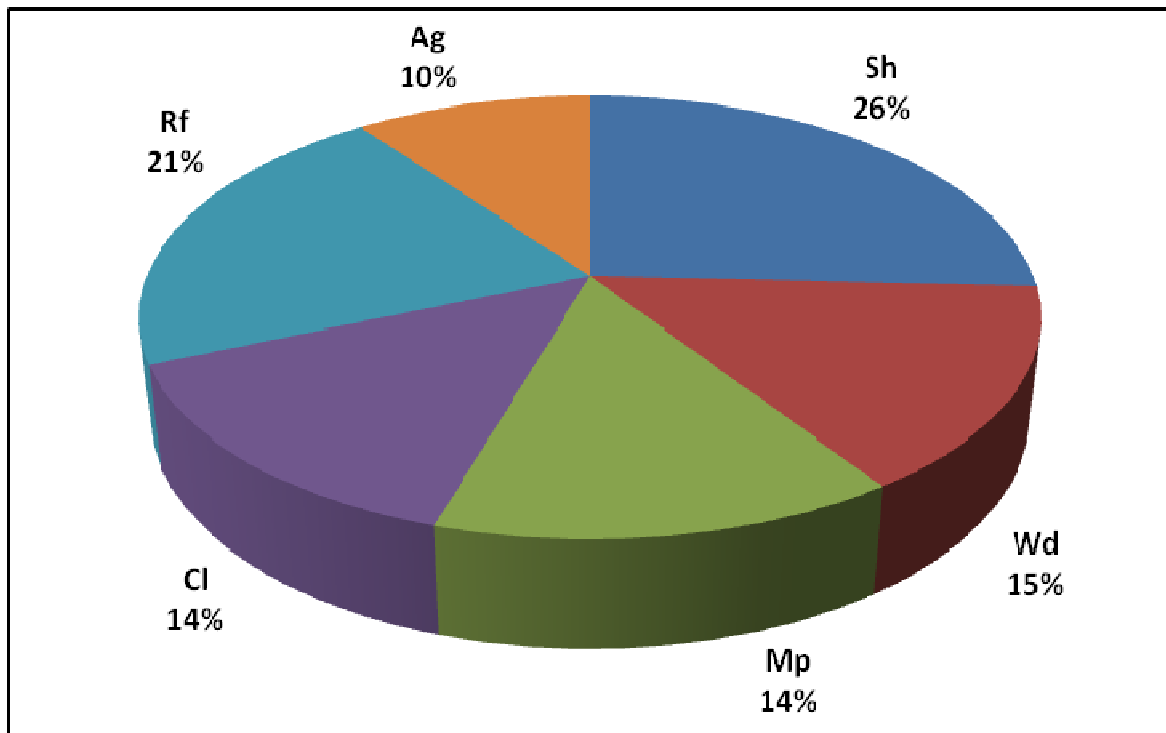


Figura 4: Total de fungos filamentosos isolados em cada lago: Sh= Stenhouse, Wd= Wanda, Mp= Macchu Picchu, Cl= *Crater Lake*, Rf= Refúgio II e Ag= Agat.



## 5.2 Identificação dos fungos

Os fungos obtidos foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS do gene do RNA ribossomal. Os 128 isolados de fungos foram agrupados por cada lago de acordo com as características macro-morfológicas em 99 morfotipos. Um representante de cada morfotipo foi identificado molecularmente por sequenciamento da região ITS. O aspecto macroscópico das colônias dos diferentes morfotipos sequenciados pode ser observado em Anexo (1 a 4). Para dois fungos, as técnicas moleculares utilizadas não foram suficientes para identificá-los em nível de espécie ou gênero. Estes isolados serão posteriormente identificados utilizando outras metodologias.

No presente estudo, a maior parte dos fungos identificados pertence ao filo *Ascomycota* (80,2%), seguido por *Zygomycota* (19%). Um táxon foi identificado como pertencente ao Reino Stramenopila (0,8%). De acordo com Adams *et al.* (2006), os fungos isolados com maior frequência na Antártica estão dentro do filo *Ascomycota* e seus anamorfos, seguidos por *Basidiomycota* e *Zygomycota*. No presente trabalho, os isolados identificados dentro de *Ascomycota* estão distribuídos em sete classes de fungos; os isolados identificados dentro de *Zygomycota* em uma classe (*Zygomycetes*); e o isolado identificado dentro de Stramenopila, dentro da família *Saprolegniaceae* (Figura 5).

Os táxons identificados neste trabalho estão listados na Tabela 1. Dezesete gêneros de fungos filamentosos foram encontrados: *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Davidiella*, *Fontanospora*, *Geomyces*, *Gibberella*, *Helgardia*, *Microdochium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus* e *Trichoderma*.

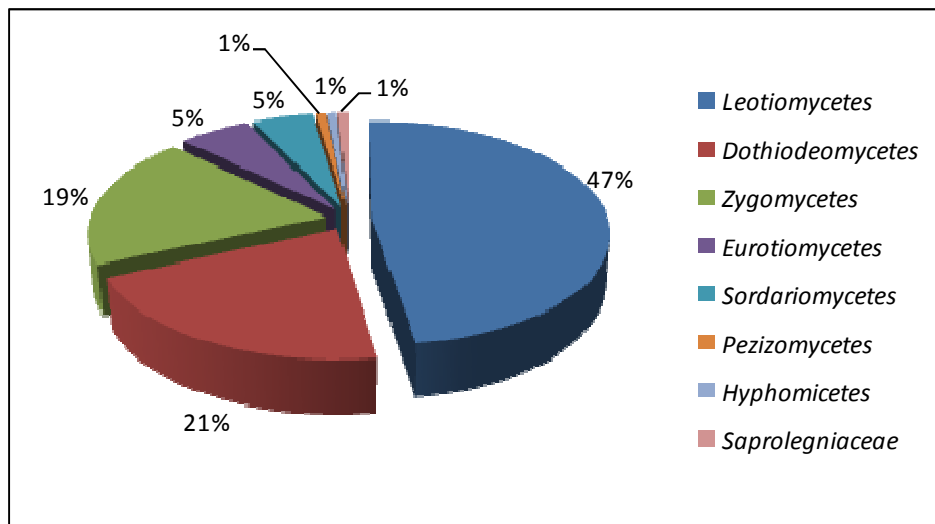


Figura 5: Distribuição em porcentagem dos isolados obtidos dos lagos antárticos.

Tabela 1: Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados dos lagos antárticos, por meio da análise das sequências da região ITS do gene do RNA ribossomal.

Código UFMGCB*	Espécie de referência (Número de acesso no GenBank)	Identidade (%)	Nº de bases analisadas	Identificação do isolado	Lago
3690	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (AM489755)	99	430	<i>A. psychrotrophicus</i>	Sh
3731	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (GU212374)	98	605	<i>C. luteo-olivacea</i>	
3734	<i>Cosmospora vilior</i> (AY805574)	98	353	<i>C. vilior</i>	
3668	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (AF455525)	98	526	<i>Cladosporium</i> sp.	
3675	<i>Onygenales</i> sp. (GU212423)	98	432	<i>Geomyces pannorum</i>	
3787	Uncultured Helotiales (FJ197910)	94	522	<i>Helotiales</i> sp.	
3662	<i>Mortierella alpina</i> (FJ025187)	98	533	<i>Mortierella alpina</i>	
3665	<i>Microdochium</i> sp. (AM502258)	96	482	<i>M. phragmitis</i>	
3688	<i>Phoma fimeti</i> (AB488489)	99	549	<i>P. fimeti</i>	
3669	<i>Phoma herbarum</i> (GU237874)	98	463	<i>P. herbarum</i>	
3694	Uncultured <i>Pyronemataceae</i> (DQ317369)	99	561	<i>Pyronemataceae</i> sp.	
3730	<i>Thelebolus microsporus</i> (GQ483644)	98	491	<i>T. microsporus</i>	
3735	<i>Thelebolaceae</i> sp. (DQ317351)	98	504	<i>Thelebolus</i> sp.	
3738	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (AM489755)	97	445	<i>A. psychrotrophicus</i>	Rf
3685	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (HM999909)	100	519	<i>C. cladosporioides</i>	

3684	<i>Davidiella tassiana</i> (FJ911883)	100	371	<i>Davidiella tassiana</i>	
3679	<i>Onygenales</i> sp. (GU212423)	96	385	<i>Geomyces pannorum</i>	
3741	<i>Geomyces pannorum</i> (DQ189224)	91	353	<i>Geomyces</i> sp.	
3783	<i>Helgardia</i> sp. (AM262430)	91	569	<i>Helgardia</i> sp.	
3707	<i>Microdochium nivale</i> (AM502260)	97	456	<i>M. nivale</i>	
3740	<i>Microdochium phragmitis</i> (AJ279449)	97	467	<i>M. phragmitis</i>	
3737	<i>Mortierellaceae</i> sp. (FJ025159)	99	556	<i>Mortierella</i> sp.	
3683	<i>Phoma</i> sp. (DQ344033)	100	446	<i>Phoma paspali</i>	
3708	Uncultured <i>Pleosporales</i> (FJ552958)	96	520	<i>Pleosporales</i> sp.	
3678	<i>Aplanopsis terrestris</i> (AB219375)	93	658	<i>Saprolegniaceae</i> sp.	
3742	<i>Thelebolaceae</i> sp. (DQ317351)	99	539	<i>Thelebolus</i> sp.	
3771	<i>Cadophora malorum</i> (GU212434)	99	540	<i>C. malorum</i>	Mp
3714	<i>Cladosporium</i> sp. (HQ115659)	97	552	<i>Cladosporium</i> sp.	
3777	<i>Fontanospora fusiramosa</i> (GQ411266)	97	490	<i>Fontanospora</i> sp.	
3768	<i>Onygenales</i> sp. (GU212423)	98	501	<i>G. pannorum</i>	
3713	<i>Geomyces pannorum</i> (FJ590611)	91	357	<i>Geomyces</i> sp.	
3792	<i>Helgardia</i> sp. (AM262430)	95	536	<i>Helgardia</i> sp.	
3774	<i>Mortierella alpina</i> (EU918703)	98	596	<i>Mortierella alpina</i>	
3781	<i>Phoma paspali</i> (GU237889)	98	470	<i>P. paspali</i>	

3715	<i>Phaeosphaeria caricinella</i> (AF439475)	97	501	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	
3775	<i>Thelebolaceae</i> sp. (DQ317351)	100	491	<i>Thelebolus</i> sp.	
3751	<i>Cladosporium</i> sp. (HQ115659)	99	471	<i>Cladosporium</i> sp.	Wd
3752	<i>Onygenales</i> sp. (GU212423)	95	443	<i>Geomyces</i> sp.	
3749	<i>Mortierella alpina</i> (FJ161918)	98	587	<i>M. alpina</i>	
3746	<i>Mortierella alpina</i> (FJ025187)	95	624	<i>Mortierella</i> sp.	
3747	<i>Phoma herbarum</i> (GU237874)	99	462	<i>P. herbarum</i>	
3748	<i>Penicillium paneum</i> (AB479336)	99	446	<i>P. paneum</i>	
3756	Uncultured <i>Pseudeurotium</i> (FJ378726)	96	546	<i>Pseudeurotium</i> sp.	
3745	<i>Thelebolaceae</i> sp. (DQ317351)	99	517	<i>Thelebolus</i> sp.	
3762	<i>Cadophora malorum</i> (GU212434)	99	495	<i>C. malorum</i>	Ap
3796	<i>Davidiella tassiana</i> (HM992818)	99	429	<i>D. tassiana</i>	
3797	<i>Gibberella moniliformis</i> (HM992798)	99	440	<i>G. moniliformis</i>	
3761	<i>Onygenales</i> sp. (GU212423)	94	513	<i>Geomyces</i> sp.	
3790	Uncultured Helotiales (FJ197867)	99	481	<i>Helotiales</i> sp.	
3766	<i>Penicillium paneum</i> (AB479336)	99	541	<i>P. paneum</i>	
3767	<i>Penicillium verrucosum</i> (AY373937)	98	541	<i>P. verrucosum</i>	
3764	<i>Penicillium</i> sp. (DQ993645)	97	529	<i>Penicillium</i> sp.	
3760	<i>Phaeosphaeria</i> sp. (EU747142)	97	510	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	

3724	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (HM999909)	100	509	<i>C. cladosporioides</i>	Cl
3795	<i>Davidiella tassiana</i> (FJ911883)	97	500	<i>Davidiella tassiana</i>	
3723	<i>Cladosporium</i> sp. (HQ115659)	99	435	<i>Davidiellaceae</i>	
3728	<i>Geomyces pannorum</i> (DQ888720)	96	521	<i>G. pannorum</i>	
3717	<i>Mortierellaceae</i> sp. (DQ317354)	98	588	<i>Mortierella</i> sp.	
3721	<i>Penicillium</i> sp. (AF125940)	98	498	<i>Penicillium</i> sp.	
3785	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (EF417483)	98	501	<i>T. longibrachiatum</i>	

\*UFMGCB: Coleção de Cultura do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Lagos amostrados: Sh=Stenhouse, Rf=Refúgio II, Mp=Macchu Picchu, Wd=Wanda, Ag=Agat, Cl=*Crater Lake*.

A espécie *Antarctomyces psychrotrophicus* foi encontrada nos lagos Stenhouse e Refúgio II. Os isolados UFMGCB 3690 e UFMGCB 3738 apresentaram 99 e 97% de identidade, respectivamente, com a sequência de *A. psychrotrophicus* (AM489755) depositada no GenBank. A sequência do isolado UFMGCB 3738 apresentou 3% de diferença com a sequência depositada no GenBank. Dessa forma, ambos isolados foram identificados como *A. psychrotrophicus*. O gênero *Antarctomyces* é formado apenas pela espécie *A. psychrotrophicus*, que foi isolada pela primeira vez por Stchigel *et al.* (2001) a partir de amostras de solo da Ilha Rei George, na Antártica. Análises com sequências da região ITS mostraram que esta espécie está relacionada com a família *Thelebolaceae*. De acordo com Arenz e cols (2006), *A. psychrotrophicus* é citado como endêmico da região Antártica e apenas um isolado foi obtido a partir de amostra de solo da Ilha Ross. Loque *et al.* (2010) isolaram pela primeira vez essa espécie a partir de um substrato vivo, a macroalga *Adenocystis utricularis*, coletada na região entre marés na Baía do Almirantado, Península Antártica.

O gênero *Cadophora* foi encontrado no lago Stenhouse, onde foi representado pela espécie *C. luteo-olivacea* (UFMGCB 3731), e nos lagos Macchu Picchu e Agat (isolados UFMGCB 3771 e 3762, respectivamente) onde foi representado pela espécie *C. malorum*. Espécies desse gênero são frequentemente encontradas como os principais microrganismos responsáveis pela decomposição de madeira em diferentes locais da Península Antártica (ARENZ *et al.*, 2006; ARENZ & BLANCHETTE 2009; BLANCHETTE *et al.*, 2004 e 2010). Algumas espécies como *C. fastigiata* e *C. melinii* já foram isoladas a partir de substratos como solo e madeira em decomposição, coletados na Antártica (ARENZ & BLANCHETTE 2009; KOSTADINOVA *et al.*, 2009), no entanto não foram isoladas dos lagos amostrados no presente estudo. A espécie *C. malorum* já foi isolada a partir de musgos (AZMI & SEPPELT, 1997; TOSI *et al.*, 2002), mostrando que o gênero possui uma ampla distribuição no continente e pode ser considerado endêmico.

O gênero *Cladosporium* foi obtido em todos os lagos amostrados com exceção do lago Agat. Vários isolados apresentaram diferentes valores de identidade com diferentes sequências de *Cladosporium* sp. depositadas no GenBank. Apenas os isolados UFMGCB 3685 e 3724, dos lagos Refugio II e

*Crater Lake*, apresentaram 99 e 100% de identidade, respectivamente, com a sequência de *C. cladosporioides* (HM999909), sendo identificados como pertencentes a esta espécie. Os fungos UFMGCB 3668, 3714 e 3751 foram identificados como *Cladosporium* sp. (6A). O isolado UFMGCB 3668 diferiu em apenas três bases em relação a duas sequências: *Cladosporium langeronii* (HQ115727) e *Cladosporium cladosporioides* (AF455525) e dessa forma foi identificado como *Cladosporium* sp. Os isolados UFMGCB 3714 e UFMGCB 3751 apresentaram 2,2 e 1,3%, respectivamente, de diferença entre diferentes espécies de *Cladosporium*. Ambos estão representados na Figura 6C em um grupo com diferentes espécies de *Cladosporium*, sustentado por um valor de *bootstrap* de 94%. Portanto, ambos os fungos foram identificados como *Cladosporium* sp. Esse gênero é considerado cosmopolita e tem sido isolado a partir de diferentes substratos no continente Antártico, como madeira em decomposição, sedimento de lagos, solo, em fezes ou associados a aves, amostras de gelo, água de lagos e associados a musgos e líquens (ELLIS-EVANS, 1985; DEL FRATE & CARETTA 1990; VISHNIAC, 1996; ARENZ & BLANCHETTE 2009; BRUNATI *et al.*, 2009; BLANCHETTE *et al.*, 2010). Espécies como *C. herbarum* e *C. sphaerospermum*, apesar de já terem sido encontradas em diferentes amostras presentes na Antártica, não foram encontradas no presente estudo nos lagos estudados.

A sequência do fungo UFMGCB 3734 apresentou 98% de identidade com a sequência de *Cosmospora vilior* (AY805574) e foi identificado como pertencente a esta espécie. Arenz e cols (2006) obtiveram três isolados desta espécie a partir de madeira coletada na Ilha Ross (Antártica). No presente trabalho, *C. vilior* foi isolada somente no lago Stenhouse.

O gênero *Davidiella* foi encontrado nos lagos *Crater Lake*, Refugio II e Agat. Os isolados UFMGCB 3796 e UFMGCB 3684 apresentaram 99 e 100% de identidade com as sequências de *Davidiella tassiana* (HM992818 e FJ911883, respectivamente). Já o isolado UFMGCB 3795 (Figura 6C) diferiu em apenas cinco nucleotídeos, quando comparada com a sequência de *Davidiella tassiana* (FJ911883). Dessa forma, esse isolado também foi identificado como *D. tassiana*. Esta espécie é considerada cosmopolita foi o fungo mais abundante isolado de folhas de *Colobanthus quitensis* coletadas em diferentes pontos da Baía do Almirantado, na Ilha Rei George, Antártica (ROSA



*et al.*, 2010). *D. tassiana* é considerado o estágio teleomorfo de *Cladosporium herbarum*. O fungo UFMGCB 3723 isolado do lago *Crater Lake*, apresentou 99% de identidade com a sequência de *Cladosporium* sp. (HQ115659), no entanto, a sequência desse isolado apresentou 1,1% e 0,3% de diferença com as sequências *C. cladosporioides* (EU622927) e *D. tassiana* (HM992818), respectivamente. Portanto, este isolado foi identificado em nível de família como *Davidiellaceae*.

O gênero *Geomyces* foi encontrado em todos os lagos amostrados. Os fungos UFMGCB 3741, 3713, 3752 e 3761 obtidos dos lagos Refúgio II, Macchu Picchu, Wanda e Agat, respectivamente, foram identificados como *Geomyces* sp.; as sequências dos fungos UFMGCB 3741, 3752 e 3761 apresentaram entre 5 e 9% de diferença com as sequências de *G. pannorum* (DQ189224 e DQ888720) (Figura 6D). Estes isolados foram identificados apenas em nível de gênero. O isolado UFMGCB 3713 apresentou 9% de diferença com a sequência de *G. pannorum* (FJ590611), portanto também foi identificado como *Geomyces* sp. Já os fungos UFMGCB 3675, 3679, 3768 e 3728 obtidos dos lagos Stenhouse, Refúgio II, Macchu Pichhu e *Crater Lake*, respectivamente, foram identificados com *G. pannorum*. Os fungos UFMGCB 3675, 3679 e 3728 apresentaram 1,9, 0,7 e 2,9% de diferença com a sequência *G. pannorum* (DQ189224) (Figura 6D). O fungo UFMGCB 3768 apresentou apenas 2% de diferença com as sequências *G. pannorum* (DQ189229 e DQ888720) (Figura 6B). *A. psychrotrophicus* e *G. pannorum* ocorrem com frequência em diferentes locais e substratos na Antártica, o que indica um possível endemismo neste ecossistema (RUISI *et al.*, 2007). Alguns trabalhos identificam o fungo *G. pannorum* como *Chrysosporium pannorum* (BRIDGE & NEWSHAM, 2009) e de acordo com Mercantini *et al.* (1989), este táxon é um exemplo de espécie queratinofílica, e é comumente isolada de solos, plantas, animais e macroalgas na Antártica (ADAMS *et al.*, 2006; DEL FRATE & CARETTA 1990; KOSTADINOVA *et al.*, 2009; LOQUE *et al.*, 2010).

As sequências dos fungos UFMGCB 3783 (obtido do lago Refúgio II) e UFMGCB 3792 do lago Macchu Picchu, apresentaram 91 e 95% de identidade, respectivamente com a sequência de *Helgardia* sp. (AM262430). O fungo UFMGCB 3783 (Figura 6D) não apresentou diferenças com a sequência de *Helgardia* sp. (AM262430). O isolado UFMGCB 3792 (Figura 6B) diferiu apenas

em duas bases da sequência de *Helgardia* sp. (AM262430). Portanto, estes isolados foram identificados como *Helgardia* sp. (ordem *Helotiales*). Além disso, dois isolados (UFMGCB 3787 e UFMGCB 3790) foram identificados como *Helotiales* sp., pois apresentaram 6 e 1% de diferença com as sequências de “Uncultured” *Helotiales* (FJ197910 e FJ197867) (Figuras 10D e 10A, respectivamente). Espécies da ordem *Helotiales* foram obtidas a partir de amostras de solo da Antártica e de diferentes profundidades do oceano Pacífico (Arenz & Blanchette 2009; BRIDGE & NEWSHAM, 2009; Burgaud *et al.*, 2009).

O gênero *Microdochium* foi encontrado em dois dos lagos amostrados: Stenhouse e Refugio II. Duas espécies do gênero *Microdochium* foram identificadas: *M. phragmitis*, representada pelos isolados UFMGCB 3665 e UFMGCB 3740 e *M. nivale*, representada pelo isolado UFMGCB 3707 (Figura 6B). Como mostrado na figura 6B, o isolado UMGCB 3665 faz parte de um grupo de fungos do gênero *Microdochium* (valor de *bootstrap* de 99%) e apresenta sequência com uma diferença de 1,4% em relação à sequência de *M. phragmitis* (AM502263). O isolado UFMGCB 3740 apresentou somente 1% de diferença com a sequência de *M. phragmitis* (AJ279449). Já o fungo UFMGCB 3707 apresentou 3% de diferença com a sequência de *M. nivale* (AM502260) depositada no GenBank. *M. nivale* foi isolado de cereais e gramíneas de ambientes frios (MAHUKU, 1998). Já a espécie *M. phragmitis* foi obtida de *C. quitensis* na Antártica (ROSA *et al.*, 2010).

Em cinco lagos pode-se observar a ocorrência do gênero *Mortierella*, representado pela espécie *M. alpina*. Os isolados UFMGCB 3662, 3749 e 3774 apresentaram 98% de identidade com as sequências *M. alpina* (FJ025187, FJ161918 e EU918703, respectivamente) e foram identificados como *M. alpina*. O isolado UFMGCB 3746 apresentou sequência com 95% de identidade com a sequência de *M. alpina* (FJ025187) e foi identificado como *Mortierella* sp. Dois isolados, UFMGCB 3717 e UFMGCB 3737, apresentaram 98 e 99% de identidade com duas sequências de *Mortierellaceae* (DQ317354 e FJ025159, respectivamente) (Figuras 10D e 10B) e apresentaram menos de 2% de diferença com uma sequência de *Mortierella* sp. (EF031108). Dessa forma, esses isolados também foram identificados como *Mortierella* sp. *Mortierella* é um gênero comumente encontrado na Antártica, principalmente a espécie *M.*

*antarctica* em diferentes ecossistemas terrestres (ADAMS et al., 2006). Além disso, *M. alpina* foi isolada de solo alpino e parece ser um táxon adaptado a ambientes com baixas temperaturas (SOGONOV & VELIKANOV, 2004).

O gênero *Penicillium* é encontrado desde os trópicos até regiões polares e é considerado cosmopolita (MCRAE et al., 1999). No entanto, enquanto o gênero possui uma distribuição mundial, a frequência de ocorrência de cada espécie parece ser mais limitada (PITT 1979). No presente estudo o gênero *Penicillium* foi encontrado em três dos lagos amostrados: Wanda, Agat e *Crater Lake*. Algumas espécies de *Penicillium* têm sido isoladas de diferentes amostras antárticas, como solo, sedimento de lagos, musgos e aves, além de amostras de água de glaciais e gelo do Ártico (Baublis et al., 1991; MCRAE et al., 1999; GUNDE-CIMERMAN et al., 2003; BRUNATI et al., 2009). Os isolados UFMGCB 3748 e UFMGCB 3766 apresentaram sequências com 99% de identidade em comparação com a sequência de *Penicillium paneum* (AB479336), o qual foi obtido a partir de tumbas do Japão. Esse táxon é tido como uma das principais espécies de *Penicillium* responsáveis pela deterioração dos monumentos (AN et al., 2009). Já o isolado UFMGCB 3767 foi identificado como *P. verrucosum*, pois apresentou 98% de identidade com a sequência de *P. verrucosum* (AY373937). Os isolados UFMGCB 3721 e 3764 foram identificados como *Penicillium* sp. (Figura 6A e 6G, respectivamente). Estes isolados formaram clados suportados por valores de *bootstrap* de 100% e 90%, respectivamente, com diferentes espécies de *Penicillium*. A variação encontrada entre as sequências dos isolados UFMGCB 3721 e 3764 e das diferentes sequências de *Penicillium* foi de 1 a 3%.

O gênero *Thelebolus* foi encontrado em quatro lagos. De acordo com De Hoog e cols (2005), *Thelebolus microsporus* predomina em lagos antárticos, com e sem influencia marinha. Quatro isolados UFMGCB 3735, 3742, 3745 e 3775 apresentaram sequências com identidade entre 98 e 100% com a sequencia *Thelebolaceae* (DQ317351). As sequências dos isolados UFMGCB 3735, 3745 e 3775 apresentaram 2% de diferença em relação às sequências de *T. microsporus* (AY957554) e *Thelebolus caninus* (AY957550) (Figura 6E). Enquanto o isolado UFMGCB 3742 não apresentou diferença com a sequencia *Thelebolus* sp. (FJ613125) (Figura 6D). Diante disso, esses isolados foram identificados como *Thelebolus* sp.

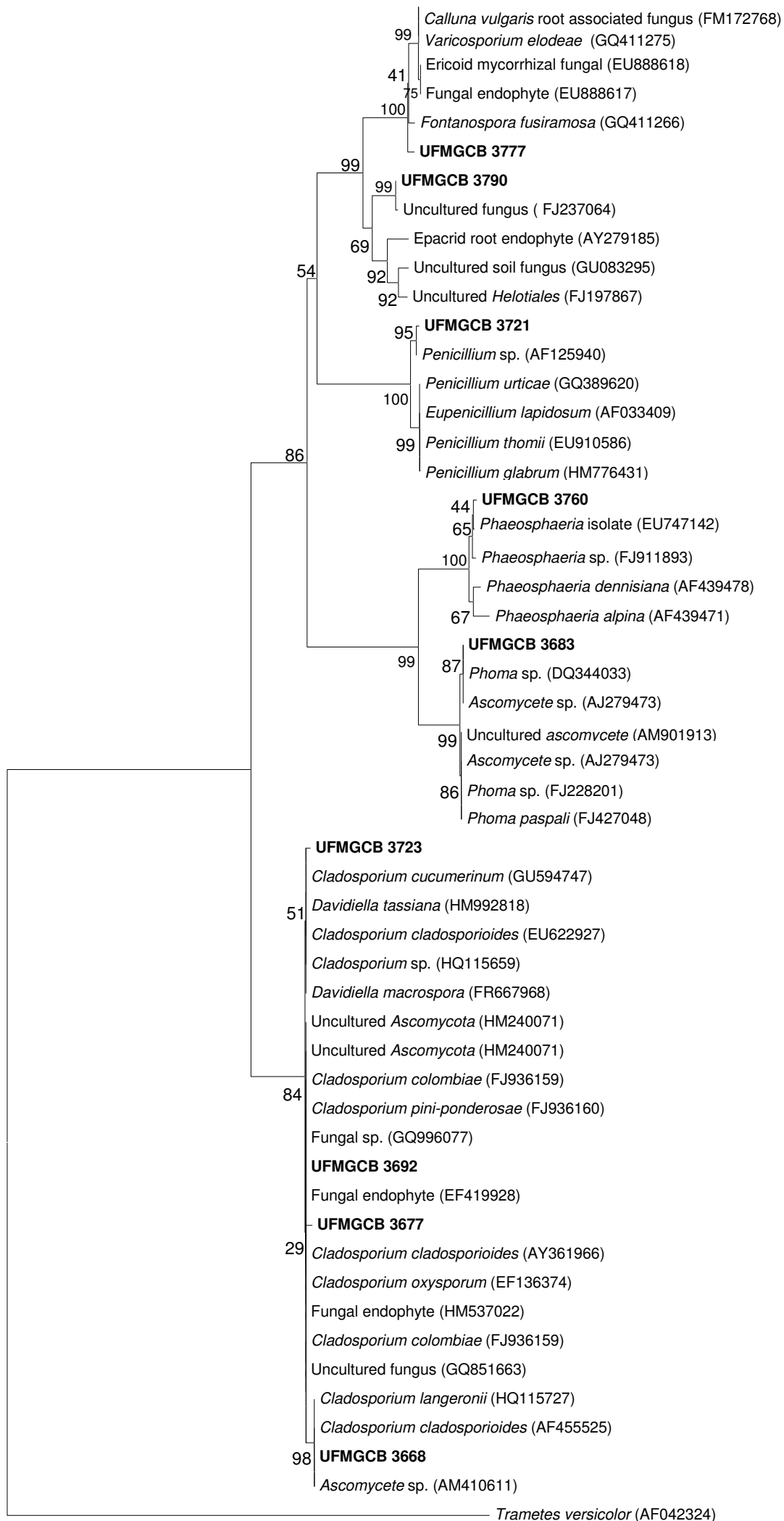
Outro gênero comumente encontrado na Antártica é *Phoma*. Este gênero já foi obtido de amostras de sedimento de lago, solo, excretas e esqueletos de aves na Antártica (ADAMS *et al.*, 2006; BRUNATI *et al.*, 2009). A espécie predominante na Antártica é *Phoma herbarum*. As espécies do gênero *Phoma* são conhecidas pelo caráter fitopatogênico, mas também são encontradas como endofíticos, sapróbios, associados a musgos e líquens (AVESKAMP *et al.*, 2010). No presente trabalho, táxons do gênero *Phoma* foram encontrados em quatro dos lagos amostrados. Dois isolados (UFMGCB 3669 e 3747) foram identificados como *P. herbarum*. Os isolados UFMGCB 3781 e 3683 foram identificados como *Phoma paspali*. A sequência do isolado UFMGCB 3683 apresentou 100% de identidade com a sequência de *Phoma* sp. (DQ344033) e somente dois nucleotídeos diferentes em relação à sequência de *Phoma paspali* (FJ427048) (Figura 6A). Um isolado, UFMGCB 3688, foi identificado como *P. fimeti*.

Duas espécies foram encontradas em apenas um lago. O fungo UFMGCB 3785 foi obtido do lago *Crater Lake* e identificado como *Trichoderma longibrachiatum*. O gênero *Trichoderma* tem sido frequentemente isolado de amostras de solo antártico (MCRAE & SEPPELT 1999; SINGH *et al.*, 2006). Já o fungo UFMGCB 3797, isolado do lago Agat, foi identificado como *Gibberella moniliformis*, que corresponde ao estágio teleomorfo de *Fusarium moniliformis*. Dois fungos, isolados dos lagos Macchu Picchu e Agat, foram identificados como *Phaeosphaeria* sp. O isolado UFMGCB 3715 apresentou sequência com identidade de 97% em comparação com sequências de duas espécies diferentes de *Phaeosphaeria* [*P. lindii* (AF439489) e *P. caricinella* (AF439475)]. O isolado UFMGCB 3760 também foi identificado como *Phaeosphaeria* sp., pois apresentou sequência com 97% de identidade com a sequência de *Phaeosphaeria* sp. (EU747142). O gênero *Phaeosphaeria* tem sido encontrado em diferentes substratos na Antártica (solo, musgos, angiospermas e macroalgas). Connell e cols (2006) obtiveram o táxon *Phaeosphaeria* como um dos isolados mais frequentes de amostras de solo antártico. Rosa e cols. (2009, 2010) obtiveram isolados do gênero a partir das angiospermas *D. antarctica* e *C. quitensis*. Loque e cols. (2010) isolaram fungos identificados como *Phaeosphaeria* sp. de macroalgas marinhas da Antártica.

O isolado de fungo UFMGCB 3777 apresentou 97% de identidade com a sequência de *Fontanospora fusiramosa* (GQ411266) e foi identificado como *Fontanospora* sp. O isolado UFMGCB 3756 apresentou 1% de diferença de nucleotídeos com as sequências *Pseudeurotium* não-cultivável (FJ378726) e *Pseudeurotium bakeri* (AY129287) (Figura 6D). Alguns isolados obtidos foram identificados como pertencentes a ordem *Pleosporales* e a família *Pyronemataceae*. O isolado UFMGCB 3708 apresentou sequência com 96% de identidade com a sequência Uncultured *Pleosporales* (FJ552958) e 3% de diferença de nucleotídeos (Figura 6F) e foi identificado como *Pleosporales*. O isolado UFMGCB 3694 apresentou 99% de identidade com a sequência de um “Uncultured” *Pyronemataceae* (DQ317369) depositada no GenBank por Arenz *et al.*, (2006) (Figura 6B). Portanto esse isolado foi identificado como *Pyronemataceae* sp.

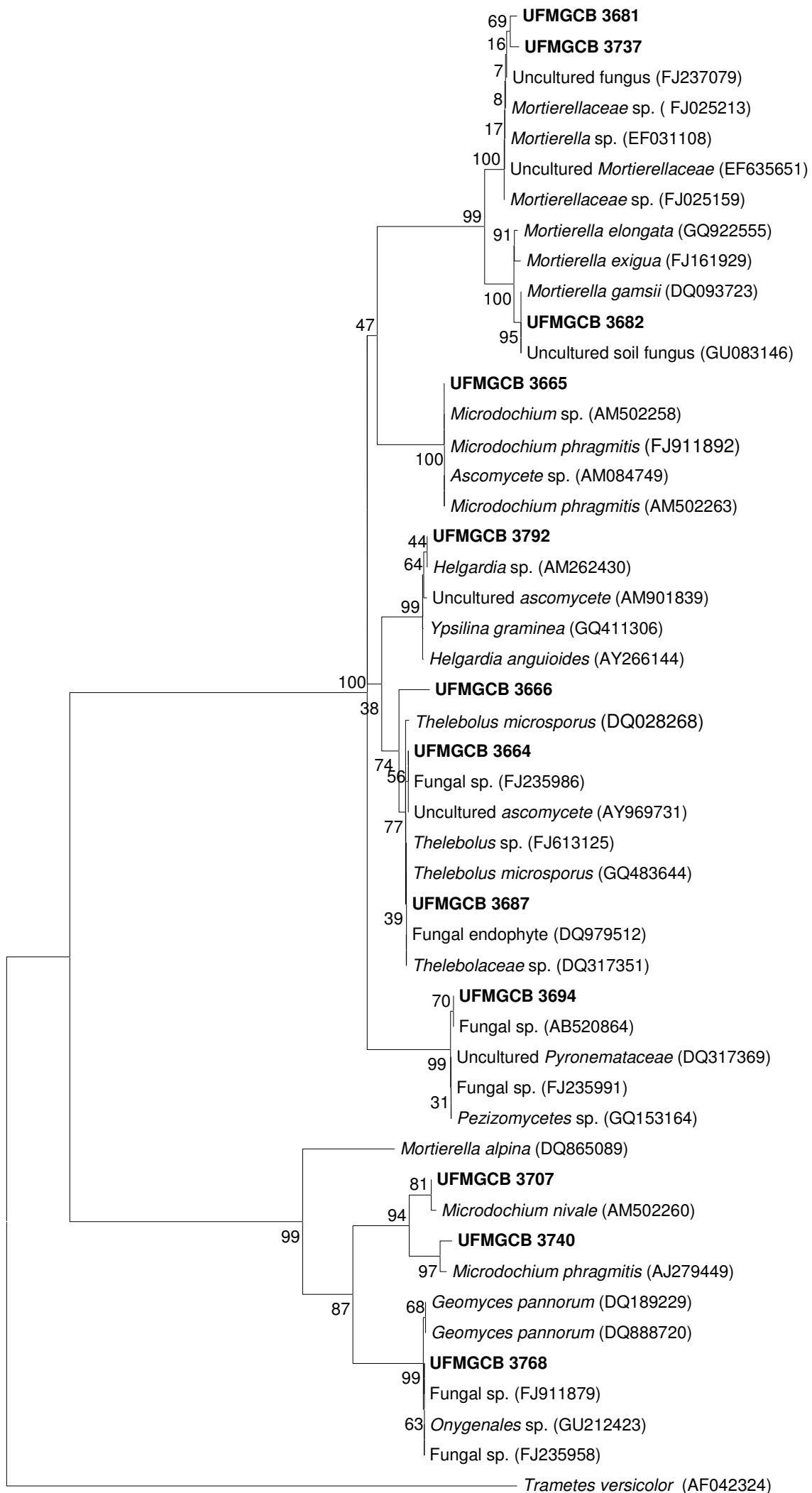
O isolado UFMGCB 3678 (encontrado apenas no lago Refúgio II) foi identificado como pertencente ao reino Straminopila. Este táxon ficou próximo filogeneticamente de diferentes espécies da família *Saprolegniaceae* (ordem *Oomycetes*). Apesar de ter apresentado 93% de identidade com a sequência de *Aplanopsis terrestris* (AB219375), a sequência deste táxon diferiu em até 6% em relação às sequências de *A. terrestris* e diferentes espécies dos gêneros *Saprolegnia* e *Pythiopsis* (Figura 6F). Dessa forma, o isolado UFMGCB 3678 foi identificado como *Saprolegniaceae* sp. A família *Saprolegniaceae* abriga gêneros de Straminopila que se comportam como sapróbios ou como parasitas de plantas aquáticas, peixes e crustáceos (LECLERC *et al.*, 2000).

(A)



0.1

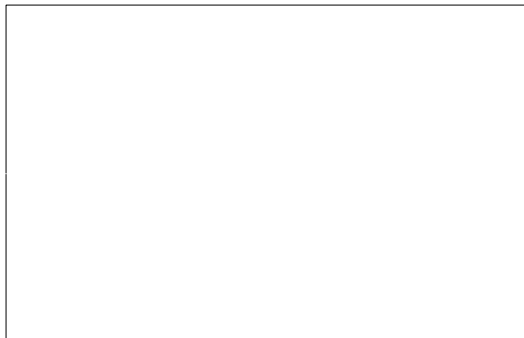
(B)



0.1

(C)

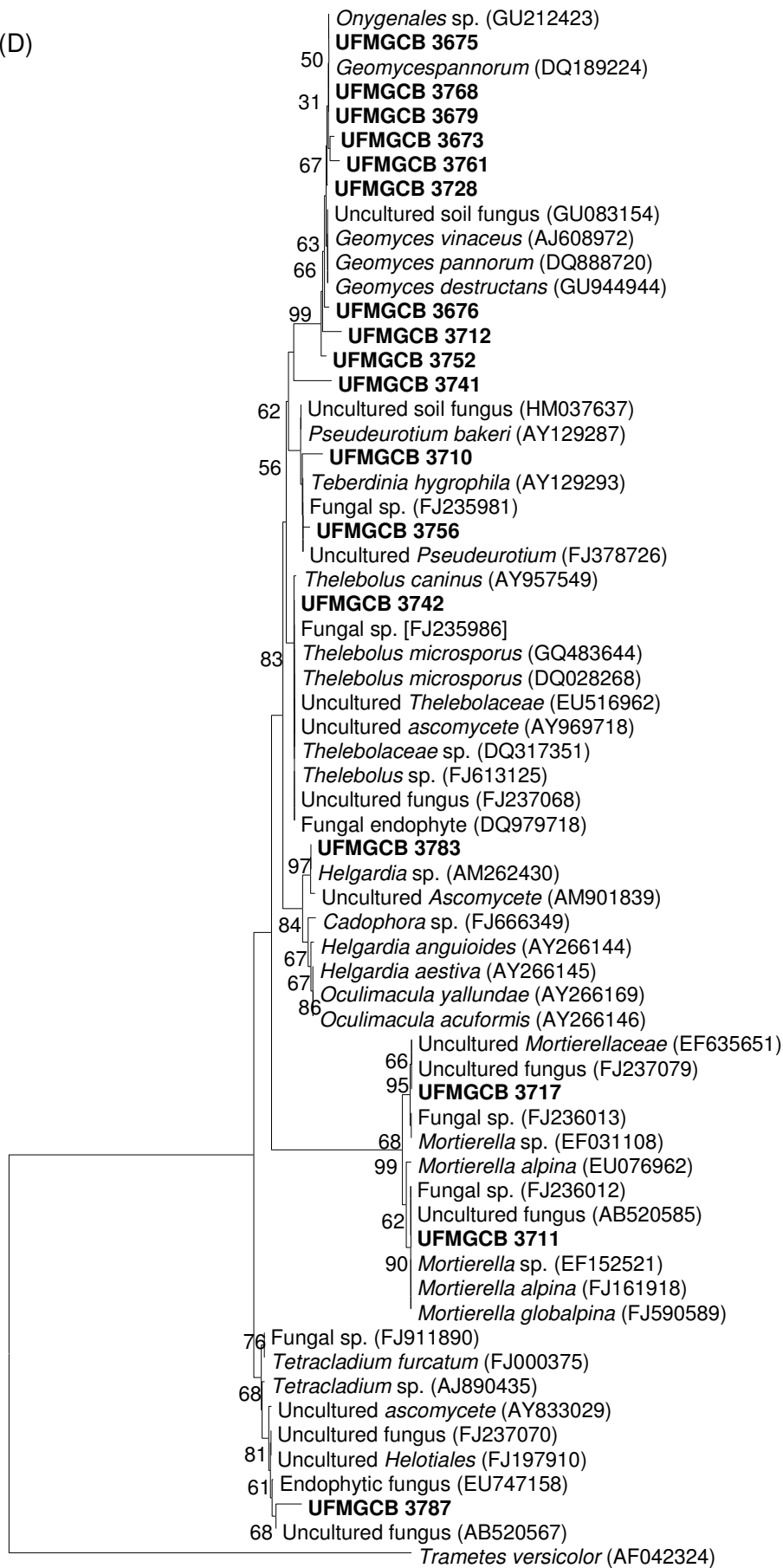
94 *Cladosporium sphaerospermum* (EU823317)  
Fungal sp. (HM999919)  
Uncultured fungus (GU721989)  
*Cladosporium cladosporioides* (EU645693)  
*Cladosporium* sp. (FJ375171)  
*Mycosphaerella hyperici* (DQ780369)  
Uncultured Ascomycota (HM162302)  
**UFMGCB 3691**  
Uncultured Ascomycota (HM240071)  
*Cladosporium oxysporum* (EU759979)  
*Cladosporium cladosporioides* (HM856622)  
*Cladosporium oxysporum* (EF136374)  
*Cladosporium cladosporioides* (HM992497)  
**UFMGCB 3794**  
*Davidiella tassiana* (HM992818)  
*Cladosporium colocasiae* (FJ216453)  
Fungal sp. (HM573347)  
*Cladosporium cladosporioides* (AY361966)  
*Cladosporium tenuissimum* (FJ361039)  
Ascomycete sp. (AM084530)  
**UFMGCB 3773**  
*Cladosporium oxysporum* (AM981239)  
**UFMGCB 3751**  
Uncultured Ascomycota (HM239975)  
**UFMGCB 3795**  
*Davidiella macrospora* (EU167591)  
*Cladosporium* sp. (HQ115659)  
Uncultured endophytic fungus (EF504588)  
Uncultured soil fungus (FN539069)  
*Cladosporium variabile* (EF679403)  
*Sphaerulina polyspora* (GU214651)  
*Cladosporium bruhnei* (EF679339)  
*Cladosporium macrocarpum* (EF679380)  
*Davidiella tassiana* (AY463366)  
*Davidiella tassiana* (FJ911883)  
*Cladosporium herbarum* (AF222830)  
*Cladosporium ossifragi* (EF679382)  
*Cladosporium* cf. *subtilissimum* (EF679390)  
Fungal sp. (EU725679)  
Uncultured fungus (GU065462)  
Uncultured soil fungus (FN539069)  
*Cladosporium macrocarpum* (EF679372)  
*Davidiella tassiana* (GU566258)  
*Cladosporium antarcticum* (EF679334)  
Fungal endophyte (HM537022)  
*Davidiella macrospora* (EF679369)  
*Davidiella macrospora* (FR667968)  
*Cladosporium cladosporioides* (EU272532)  
**UFMGCB 3684**  
*Cladosporium colombiae* (FJ936159)  
Uncultured fungus (GQ851663)  
*Cladosporium cladosporioides* (HM999909)  
**UFMGCB 3714**  
Uncultured fungus (GU065626)  
*Cladosporium pini-ponderosae* (FJ936160)  
*Trametes versicolor* (AF042324)



0.2

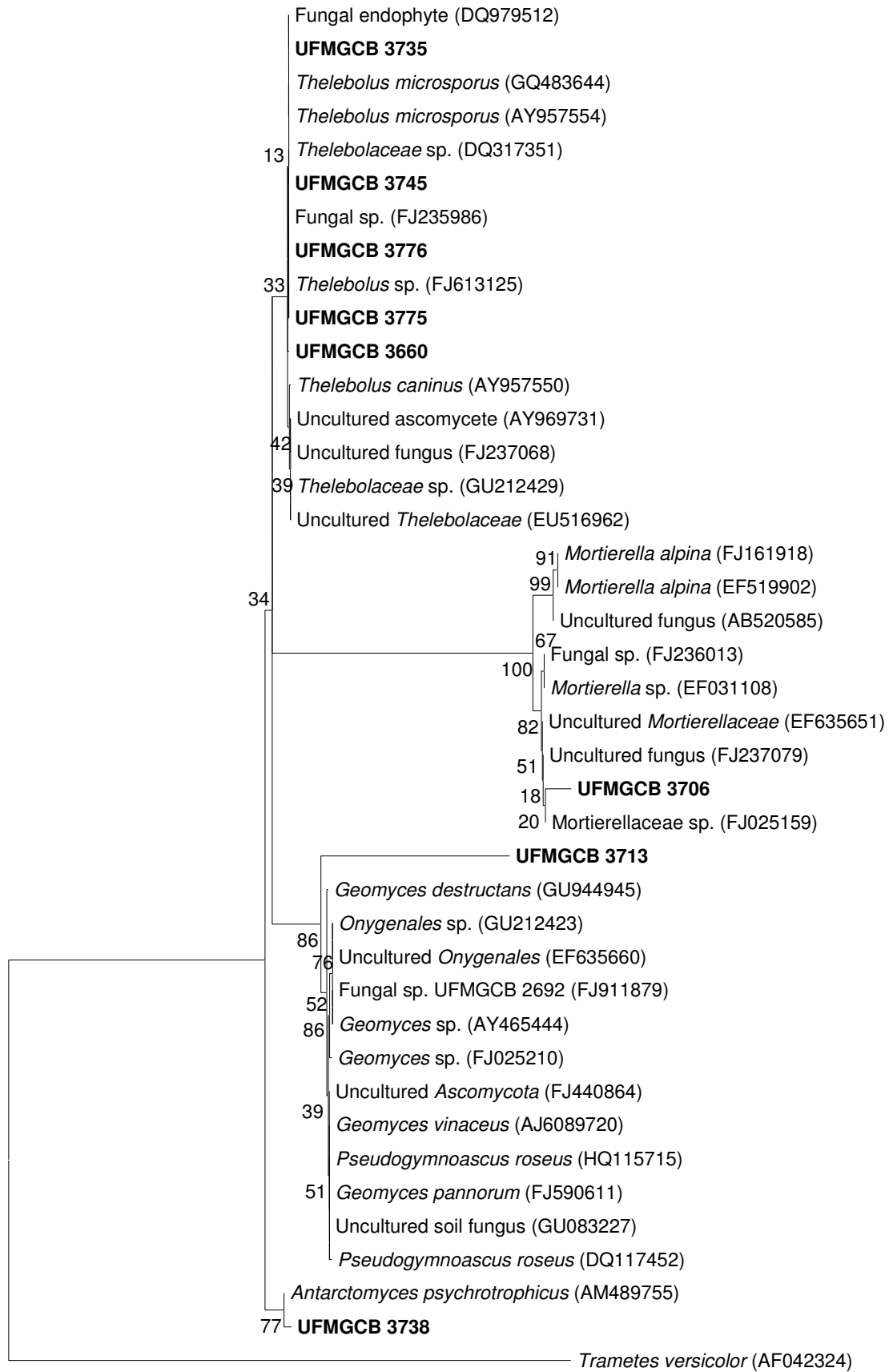


(D)



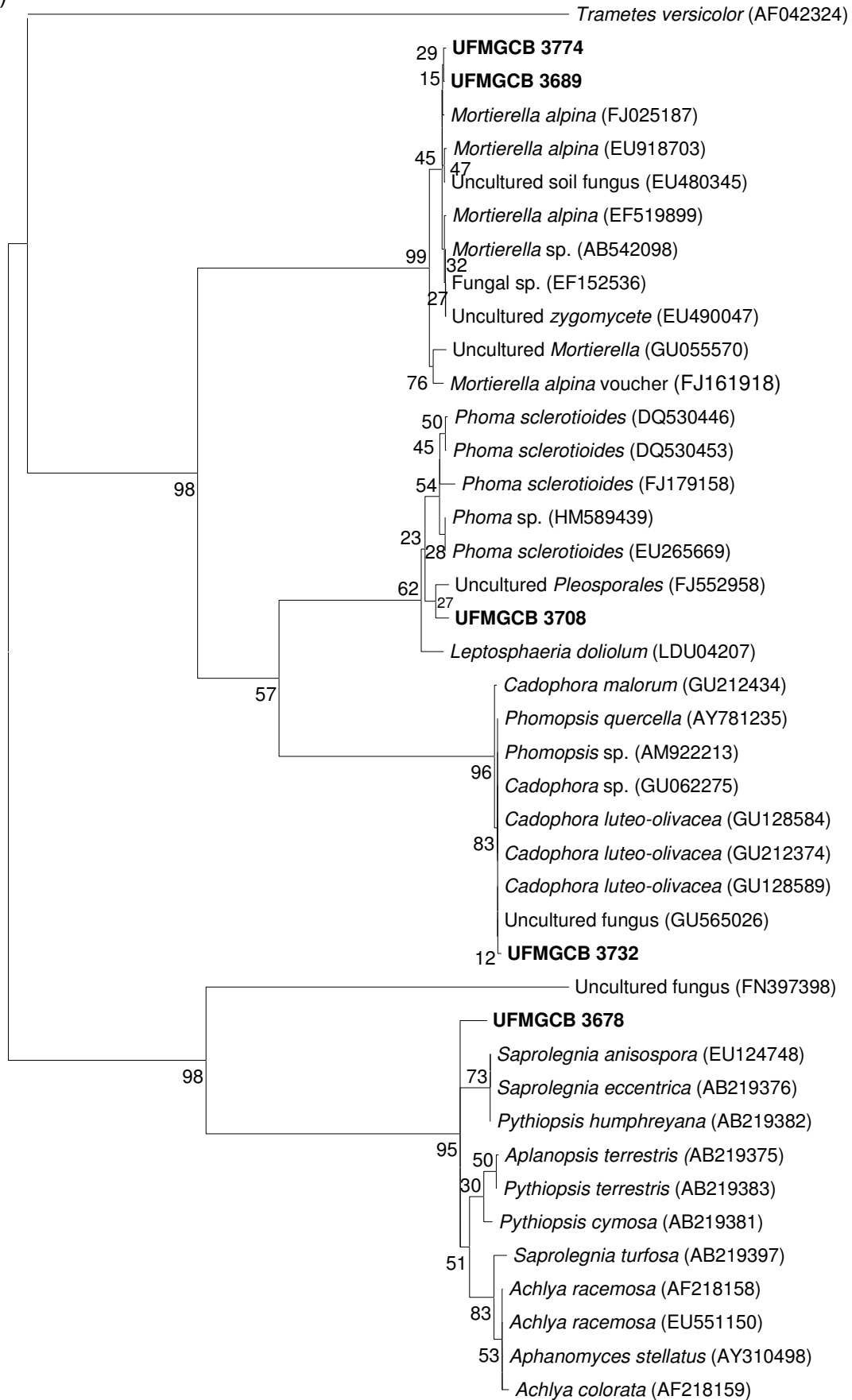
0.1

(E)



0.1

(F)



0.05

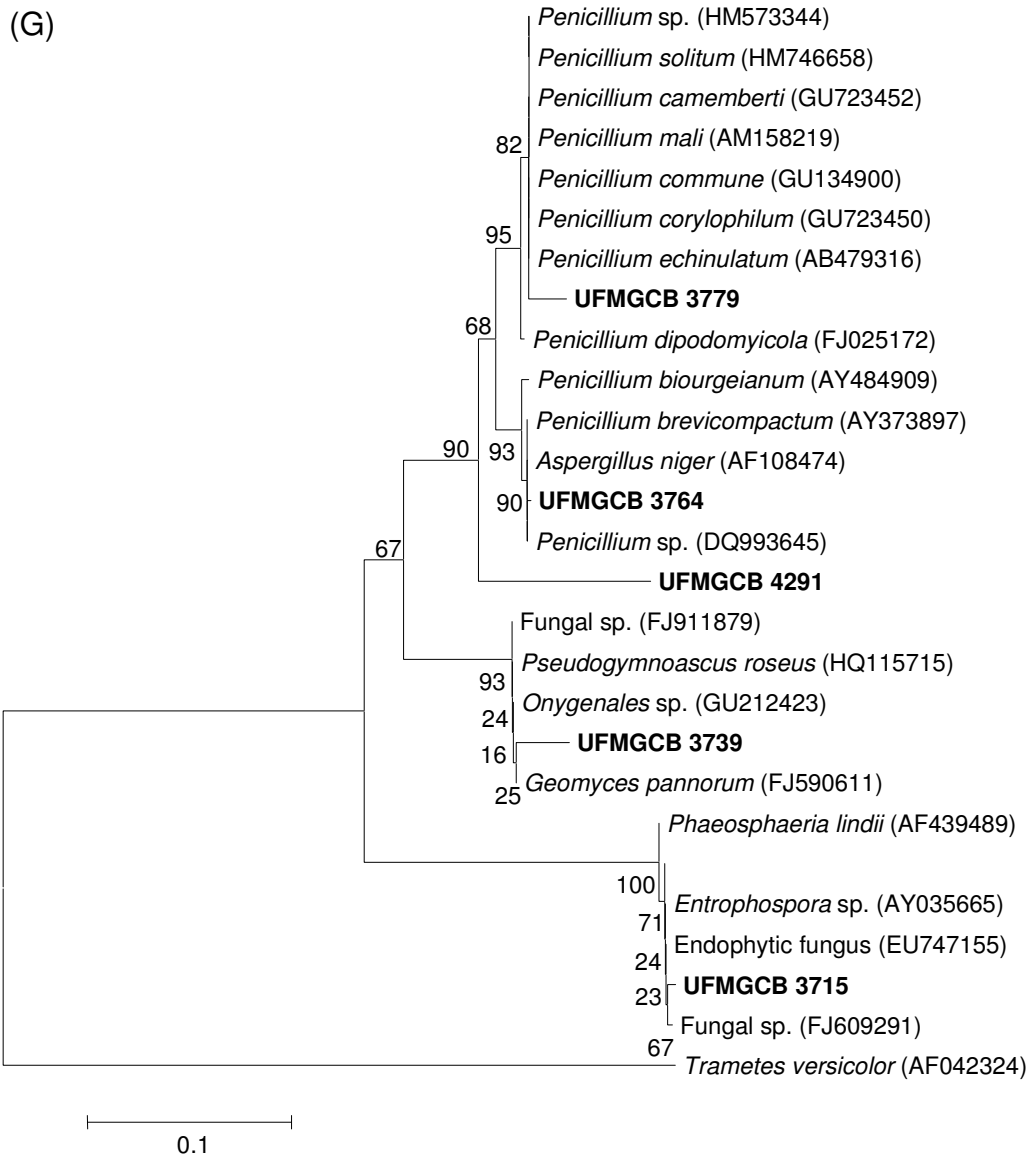


Figura 6: Árvores filogenéticas (A a G) mostrando a relação entre os isolados de fungos isolados de lagos antárticos e sequências obtidas do GenBank. O número de acesso das sequências retiradas do program BlastN encontra-se entre parênteses. As sete árvores foram construídas baseadas em fragmentos da região ITS do gene do rRNA utilizando o método de *Neighbor-joining*, parâmetro Composto Máximo de Likelihood. Uma análise de *bootstrap* foi realizada com 1.000 repetições. *Trametes versicolor* (AF042324) foi usado como grupo externo. Somente foram construídas arvores filogenéticas para os isolados que apresentaram sequências com identidade menor do que 98%.

### 5.3 Diversidade da comunidade fúngica dos lagos

Na Antártica, os microrganismos representam importantes modelos para estudos de distribuição, abundância, estrutura e função de comunidades microbianas. A distribuição dos fungos na Antártica vem sendo estudada principalmente em alguns substratos como musgos, madeira em decomposição, solo, sedimento de lagos, líquens, macroalgas, angiospermas e animais como aves, mamíferos e invertebrados (DEL FRATE & CARETTA, 1990; VISHNIAC, 1996; STCHIGEL *et al.*, 2001; TOSI *et al.*, 2002; BLANCHETTE *et al.*, 2004 e 2010; ADAMS *et al.*, 2006; ARENZ *et al.*, 2006; ONOFRI *et al.*, 2007; ARENZ & BLANCHETTE 2009; BRUNATI *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2009 e 2010; LOQUE *et al.*, 2010 e VAZ *et al.*, 2011). Contudo, poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de se estudar a distribuição e diversidade de fungos presentes na água de lagos antárticos.

No presente trabalho, a distribuição dos táxons nos seis lagos estudados pode ser visualizada na Tabela 2. O cálculo da abundância de cada táxon foi realizado a partir do total de 126 isolados de fungos (dois isolados não foram identificados até o momento). Os gêneros encontrados com maior frequência foram *Geomyces*, *Mortierella*, *Thelebolus* e *Cladosporium*. O gênero prevalente foi *Geomyces* e *G. pannorum* foi a espécie mais abundante. O gênero *Geomyces* apresenta alta tolerância a baixas temperaturas, dissecação e alta salinidade, e *G. pannorum* tem sido a única espécie do gênero obtida de amostras de sedimento de lagos na Antártica (BRUNATI *et al.*, 2009). De acordo com Arens e cols (2006) as espécies do gênero *Geomyces* em geral são capazes de colonizar e utilizar diferentes fontes de carbono. Estes fungos foram isolados como os mais abundantes em amostras de madeira em decomposição da Antártica por Blanchett e cols (2010). A alta frequência de isolamento do gênero *Geomyces* e da espécie *G. pannorum* nos diferentes lagos estudados pode ser explicada pela capacidade de tolerância deste fungo a condições extremas encontradas na Antartica. A presença deste gênero em lagos que são influenciados por águas oceânicas pode ser explicada pela plasticidade em colonizar e utilizar diferentes fontes de carbono.

O gênero *Mortierella* foi o segundo mais abundante obtido neste estudo (14,3%) e único representante do filo *Zygomycota* (ordem *Mortieralles*). O

gênero já foi obtido com frequência de amostras de solo antártico, sendo as principais espécies encontradas *M. antarctica*, *M. minutissima* e *M. parvispora* (DEL FRATE & CARETTA, 1990; MCRAE & SEPPELT 1999; HUGHES *et al.* 2003; ADAMS *et al.*, 2006). Assim como no presente trabalho, Ellis-Evans (1985) obtiveram vários isolados identificados como *Mortierella* sp., a partir de amostras de sedimento e de água de cinco lagos antárticos.

Os gêneros *Thelebolus* e *Cladosporium* vêm sendo frequentemente obtidos de diferentes substratos na Antártica, como amostras de solo, sedimentos de lago e madeira em decomposição. A maioria dos fungos obtidos nos ecossistemas da Antártica vem sendo identificada em seu estado anamorfo. O ciclo de vida dos organismos no estado anamorfo é finalizado em menos tempo, diminuindo assim os gastos metabólicos com a produção de esporos (RUISI *et al.*, 2007). No entanto, o gênero *Thelebolus* representa uma exceção, pois é frequentemente obtido em substratos da Antártica reproduzindo-se de forma sexuada (DE HOOG *et al.*, 2005). De acordo com Brunati e cols (2009), a comunidade de fungos presentes em amostras de sedimento de lagos antárticos pode ser dominada por poucos gêneros fúngicos, dentre eles *Thelebolus*. Entre os gêneros cosmopolitas encontrados na Antártica, *Cladosporium* é um dos mais frequentes, principalmente em amostras de solo (ADAMS *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2006; KOSTADINOVA *et al.*, 2009). O isolamento de espécies de *Thelebolus* e *Cladosporium* em amostras de solo, água e sedimento de lagos pode ser consequência do aporte de matéria orgânica além da deposição de sedimento nos lagos.

Os táxons *M. alpina* e *T. microsporus* foram obtidos com a mesma abundância, seguidos da espécie *Antarctomyces psychrotrophicus*. Estes fungos foram menos frequentes apenas do que *G. pannorum*. *A. psychrotrophicus* é descrito como endêmico para Antártica e já foi encontrada em amostras terrestres, aquáticas e em fezes de animais (DEL FRATE & CARETTA, 1990). O gênero *Penicillium* foi obtido com 3,1% de abundância, juntamente com as espécies *D. tassiana* e *C. cladosporioides*. Ellis-Evans (1985) encontrou *Penicillium* como o gênero mais abundante em um estudo sobre a diversidade fúngica em lagos antárticos, mas também obteve, em menor frequência, a espécie *C. cladosporioides* em dois dos lagos amostrados.

Além disso, no presente estudo, vários táxons foram encontrados em baixa frequência na comunidade de fungos. *Cadophora luteo-olivacea* e *C. malorum*, *M. phragmitis*, *Penicillium paneum*, *P. herbarum* e *P. paspali* foram encontradas com taxa de abundância de 1,6%. As espécies *C. vilior*, *G. moniliformis*, *M. nivale*, *P. verrucosum*, *P. fimeti* e *T. longibrachiatum* apresentaram os menores valores de abundância (0,8%), e foram representadas por apenas um isolado. Apenas um táxon do reino Straminopila foi obtido (0,8% de abundância) e identificado dentro da família *Saprolegniaceae*.

Tabela 2: Número de isolados e porcentagem de abundância dos fungos obtidos dos seis lagos antárticos.

Táxons	Lagos amostrados* e número de isolados						Abundância (%)
	Sh	Mp	Rf	Wd	Ap	Cl	
<i>Mortierella</i> sp	-	-	10	5	-	3	14,3
<i>Geomyces pannorum</i> Sigler & Carmichael.	4	5	2	-	-	6	13,5
<i>Geomyces</i> sp.	-	2	3	4	4	-	10,3
<i>Thelebolus</i> sp.	4	2	1	1	-	-	6,3
<i>Cladosporium</i> sp.	5	2	-	1	-	-	6,3
<i>Mortierella alpina</i> Peyronel	3	1	-	2	-	-	4,8
<i>Thelebolus microsporus</i> (Berk. & Broome) Kimbrough	6	-	-	-	-	-	4,8
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> Stchigel & Guarro	3	-	2	-	-	-	4,0
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-	1	3	3,1
<i>Davidiella tassiana</i> (De Not.) Crous & U. Braun	-	-	1	-	2	1	3,1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	-	-	1	-	-	3	3,1
<i>Pseudeurotium</i> sp.	-	-	-	3	-	-	2,4
<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew	2	-	-	-	-	-	1,6
<i>Cadophora malorum</i> (Kidd & Beaumont) W. Gams	-	1	-	-	1	-	1,6
<i>Helgardia</i> sp.	-	1	1	-	-	-	1,6
<i>Helotiales</i> sp.	1	-	-	-	1	-	1,6
<i>Microdochium phragmitis</i> Syd.	1	-	1	-	-	-	1,6
<i>Penicillium paneum</i> Frisvad	-	-	-	1	1	-	1,6
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	-	1	-	-	1	-	1,6
<i>Phoma herbarum</i> Westend.	1	-	-	1	-	-	1,6



<i>Phoma paspali</i> P.R. Johnst.	-	1	1	-	-	-	1,6
<i>Pleosporales</i> sp.	-	-	2	-	-	-	1,6
<i>Saprolegniaceae</i> sp.	-	-	1	-	-	-	0,8
<i>Cosmospora vilior</i> (Starbäck) Rossman & Samuels	1	-	-	-	-	-	0,8
<i>Davidiellaceae</i> sp.	-	-	-	-	-	1	0,8
<i>Fontanospora</i> sp.	-	1	-	-	-	-	0,8
<i>Gibberella moniliformis</i> Wineland	-	-	-	-	1	-	0,8
<i>Microdochium nivale</i> (Fr.) Samuels & I. C. Hallett	-	-	1	-	-	-	0,8
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	-	-	-	-	1	-	0,8
<i>Phoma fimeti</i>	1	-	-	-	-	-	0,8
<i>Pyronemataceae</i> sp.	1	-	-	-	-	-	0,8
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	-	-	-	-	-	1	0,8
<b>Total de isolados</b>	<b>33</b>	<b>17</b>	<b>27</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>100</b>

\* Lagos amostrados: Sh=Stenhouse, Rf=Refúgio II, Mp=Macchu Picchu, Wd=Wanda, Ag=Agat, Cl=*Crater Lake*.

A diversidade de espécies nos diferentes locais de coleta foi avaliada por meio da utilização de dois índices de diversidade: Shannon ( $H'$ ) e Simpson (Tabela 3). O índice de Shannon relaciona dois componentes de diversidade, a riqueza de espécies e a equitabilidade, atribuindo maior peso ao primeiro componente. De forma que, quanto maior for o valor do índice, maior a riqueza de espécies e, quanto menor o valor do índice, menor a riqueza de espécies. Em relação a este índice, os maiores valores foram encontrados para as comunidades fúngicas dos lagos Stenhouse e Refúgio ( $H' = 2,34$  e  $2,16$ , respectivamente), indicando maior diversidade de espécies nestes lagos. Os valores encontrados podem ser explicados, uma vez que o índice de Shannon atribui maior peso a riqueza de espécies e, pelo fato desses lagos terem apresentado o maior número de táxons (13). Pode-se observar também que ambos os lagos apresentaram valores semelhantes para vários fatores físico-químicos (condutividade, sólidos totais dissolvidos, salinidade, pH e teor de clorofila) (Tabela 3). De acordo com este índice, os lagos Macchu Picchu e Agat são semelhantes em relação à diversidade da comunidade fúngica, pois apresentaram o mesmo valor ( $H' = 2,03$ ). Estes lagos também apresentaram valores de pH (um dos mais baixos entre os lagos amostrados), potencial de oxi-redução e teores de clorofila semelhantes (Tabela 3). Por outro lado, o menor valor de  $H'$  foi encontrado para o lago *Crater Lake* ( $H' = 1,74$ ), indicando que o lago possui uma diversidade menor quando comparado com o restante dos lagos estudados. O lago *Crater Lake* caracteriza-se como um lago de cratera, que apresentou a maior temperatura ( $6,16^{\circ}\text{C}$ ) e o menor teor de clorofila dentre os lagos amostrados (Tabela 3).

O índice de Simpson também foi utilizado para calcular a diversidade da comunidade fúngica dos lagos amostrados. Esse índice indica a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso da comunidade pertencerem a espécies diferentes, atribuindo assim maior peso para a equitabilidade. Portanto, os maiores valores deste índice indicam uma maior diversidade e ausência de dominância; já os menores valores indicam uma menor diversidade e presença de dominância. Os valores encontrados para as comunidades fúngicas dos diferentes lagos amostrados foram semelhantes, e o maior valor para o índice de Simpson foi obtido para o lago Stenhouse (0,88) e o menor valor no lago *Crater Lake* (0,79). Esses dados são semelhantes aos encontrados utilizando o

índice de Shannon para os mesmos lagos (Stenhouse e *Crater Lake*). Estes resultados mostram que houve uma distribuição homogênea das espécies obtidas nestes lagos. Em relação ao índice de Simpson, três lagos (Macchu Picchu, Refúgio II e Wanda) apresentaram os mesmos valores (0,82). Essas diferenças entre os índices utilizados podem ser explicada pelo maior peso atribuído a equitabilidade no índice de Simpson.

Os valores encontrados para os índices de Shannon e Simpson mostraram que as comunidade de fungos dos lagos amostrados possuem uma diversidade maior em relação à comunidade fúngica da angiosperma presente em diferentes locais da Antártica (*Colobanthus quitensis*), investigada por Rosa *et al.* (2010). De acordo com estes autores, a comunidade de fungos associada a *C. quitensis* mostrou uma baixa riqueza de espécies e presença de dominância de poucos táxons.

A similaridade entre as comunidades de fungos dos lagos amostrados foi estimada utilizando-se o coeficiente de Sorensen (*QS*) e o índice de Bray-Curtis (*B*). O coeficiente de Sorensen é utilizado para dados binários (presença ou ausência); atribui mais peso sobre as ocorrências comuns do que em desencontros, e utiliza valores entre 0 (nenhuma similaridade) e 1 (similaridade absoluta). A Figura 7A representa a similaridade entre as diferentes comunidades fúngicas por meio do coeficiente de Sorensen. O lago Refúgio II apresentou maior similaridade com o lago *Crater Lake*. O mesmo foi observado para os lagos Macchu Picchu e Wanda. Dos táxons listados na Tabela 2, quatro deles (*D. tassiana*, *Mortierella* sp., *G. pannorum* e *C. cladosporioides*) foram obtidos dos lagos Refúgio II e *Crater Lake* e 16 táxons não foram compartilhados em nenhum dos dois lagos (20 encontros). De forma semelhante, quatro táxons (*Geomyces* sp., *Thelebolus* sp., *Cladosporium* sp. e *M. alpina*) ocorreram nos lagos Macchu Picchu e Wanda, e 18 táxons não foram encontrados em nenhum desses lagos (22 encontros). A similaridade encontrada nestes lagos foi um reflexo do alto número de encontros obtidos (presença ou ausência de táxons). Os lagos Agat e Stenhouse compartilharam apenas o táxon *Helotiales* sp. e apresentaram o menor valor de similaridade, de acordo com o coeficiente de Sorensen.

O índice de Bray-Curtis (*B*) atribui maior peso a abundância das espécies, de forma que os valores mais próximos de 0 indicam que as

comunidades não compartilham nenhuma espécie e os valores próximos de 1 indicam que as comunidades compartilham todas as espécies com a mesma abundância. A Figura 7B ilustra a similaridade dos lagos amostrados, estimada por meio do índice de Bray-Curtis. As comunidades de fungos dos lagos Macchu Picchu e Stenhouse apresentaram maior similaridade assim como as dos lagos Refúgio II e Wanda. Estes resultados são semelhantes aos mostrados com o uso do índice de Simpson que mostrou os mesmos valores para os três lagos (Macchu Picchu, Refúgio II e Wanda). Por outro lado, Stenhouse e Agat foram os lagos com menor similaridade. Os diferentes valores de similaridade atribuídos aos lagos amostrados podem ser devido às diferentes características físico-químicas encontradas nos diferentes ecossistemas estudados, as quais podem influenciar a riqueza e frequência de espécies presentes nos lagos antárticos.

De acordo com Priddle & Heywood (1980), os lagos antárticos são influenciados pelo regime térmico, que afeta não só a temperatura da água e o período em que a superfície do lago permanece congelada, mas também a disponibilidade de águas de drenagem, o grau de intemperismo, e conseqüentemente a composição de minerais dentro da bacia e a composição da água dos lagos. Além da temperatura, outras características como pH, salinidade e oxigênio dissolvido também influenciam a riqueza de espécies das comunidades presentes nestes ambientes. Na Tabela 3 são mostradas as contagens totais de fungos isolados dos lagos antárticos e as medições dos parâmetros físico-químicos para cada lago. As contagens totais de fungos variaram de 6,5 a 62,0 UFC/L. As maiores contagens foram obtidas nos lagos *Crater Lake* e Refugio II, (62,0 e 54,0 UFC/L, respectivamente), e as menores nos lagos Wanda (6,5 UFC/L) e Agat (10,33 UFC/L). O lago Stenhouse apresentou contagem de 26,18 UFC/L, que foi semelhante à encontrada no lago Macchu Picchu (28,16 UFC/L). Os valores de contagens de fungos totais foram semelhantes às contagens de leveduras encontradas por Brandão (2010) em lagos antárticos. A autora obteve as menores contagens de leveduras totais em lagos antárticos, em relação a lagos tropicais e um lago andino. Essas diferenças podem ter ocorrido principalmente devido a menor disponibilidade de nutrientes nos lagos das regiões frias quando comparado com os lagos de outras regiões climáticas.

As temperaturas das águas dos lagos variaram de 0,2 a 6,1°C. As temperaturas mais elevadas foram encontradas nos lagos *Crater lake* (6,1°C) e Refúgio II (4,2°C); lagos onde também foram obtidas as maiores contagens de fungos. As temperaturas mais baixas foram encontradas nos lagos Stenhouse e Macchu Picchu (0,2 e 0,7°C, respectivamente). Nesses lagos, as contagens de fungos totais foram semelhantes (26,18 e 28,16 UFC/L). De acordo com Brandão (2010), a temperatura foi um dos fatores responsáveis pelas menores contagens de leveduras totais encontradas em lagos antárticos em relação às contagens encontradas em lagos andinos e tropicais. Os valores de condutividade foram baixos para quase todos os lagos, com exceção dos lagos Wanda e Agat (26,4 a 22,37 mS/cm, respectivamente) que apresentaram os valores mais altos. O restante dos lagos apresentou valores de condutividade que variaram de 0,11 a 3,7 mS/cm. Os valores obtidos para os sólidos totais dissolvidos foram altos apenas para os lagos Wanda e Agat, (30,2 e 25,78 g/L, respectivamente). A partir destes resultados é possível inferir que os sólidos dissolvidos na água (íons e moléculas), podem ser responsáveis pelo aumento do valor da condutividade nesses lagos, e podem ser consequência do aporte de águas oceânicas.

Enquanto o valor de salinidade normalmente encontrado em águas oceânicas é de 35 ppt (a 25°C), os valores de salinidade encontrados para os lagos Wanda e Agat foram de 29,17 e 24,5 ppt, respectivamente. Estes lagos recebem influência direta de águas oceânicas. O lago Macchu Picchu apresentou valor intermediário de salinidade (3,7 ppt) em comparação com outros lagos amostrados, o que pode ser devido a menor influência de águas oceânicas em comparação com os lagos Wanda e Agat. Além disso, o lago Macchu Picchu é formado por água de degelo de um grande glacial, tendo assim valores menores de condutividade, sólidos totais dissolvidos e salinidade. Os lagos que apresentaram os maiores valores de salinidade, Wanda e Agat, também apresentaram as menores contagens de fungos totais. Estes resultados são semelhantes ao encontrados por Brunati e cols (2009). Estes autores encontram as maiores contagens de fungos totais ( $8 \times 10^3$  UFC/g) em sedimentos de lagos sem influência de águas oceânicas. De acordo com Simons e cols. (1993), a maioria dos lagos da Antártica é estratificada devido à combinação de diferentes fatores, principalmente a temperatura. No

entanto, durante o verão, o derretimento da camada superficial de gelo permite a entrada de águas de degelo e a entrada de correntes marinhas, resultando em um gradiente salino nestes lagos. Isto por sua vez determina a ocorrência de microrganismos e a sobrevivência dos mesmos nesses ambientes, incluindo os fungos.

Em relação ao oxigênio dissolvido, o maior valor foi obtido nos lagos *Crater Lake* (56,45 mg/L), Refugio II (31,46 mg/L) e Wanda (24,92 mg/L). O menor valor foi observado no lago Stenhouse (1,01 mg/L). No lago Agat não foi possível realizar a medida de oxigênio dissolvido por problemas de logística. Dentre os gases dissolvidos na água, o oxigênio é um dos mais importantes na dinâmica dos ecossistemas aquáticos (ESTEVES, 1998). O oxigênio sofre variações diárias devido a sua ligação direta com processos de decomposição da matéria orgânica, fotossíntese e aeração, além de ser influenciado pela temperatura, salinidade e pressão atmosférica. Em relação aos valores de pH encontrados, os lagos apresentaram valores próximos da neutralidade, no entanto, os lagos Stenhouse e Refugio II apresentaram valores mais altos de pH. Os lagos antárticos são altamente influenciados pela lixiviação dos solos e rochas e entrada de águas oceânicas que podem determinar os valores de pH e condutividade.

O potencial redox mede a capacidade do ambiente de fornecer elétrons a um agente oxidante ou de retirar elétrons de um agente redutor. Os valores de potencial redox foram relativamente altos em todos os lagos amostrados, (132,5 a 227,14 mV). Os valores positivos de potencial redox indicam que as substâncias dissolvidas predominantes nos lagos possuem um caráter oxidante, que pode ser resultado do conteúdo de oxigênio disponível (SILVA 2008).

O teor de clorofila em um ambiente aquático constitui um indicador das condições tróficas da água; um lago com baixa disponibilidade de matéria orgânica e níveis de clorofila em torno de 4,2 µg/L pode ser considerado oligotrófico (VOLLENWEIDER & KERÉKES 1981). Os valores de clorofila obtidos nos locais de coleta variaram de 0,78 a 3,4 µg/L, mostrando o perfil oligotrófico dos seis lagos estudados. Além da quantidade de nutrientes presentes nos lagos antárticos, as baixas temperaturas que os lagos de ambientes frios estão submetidos também é um fator que pode reduzir o

metabolismo dos fungos, limitando o crescimento e a multiplicação desses microrganismos. Estes fatores bem como os demais listados na tabela 3 são responsáveis por limitar a ocorrência de fungos nos lagos antárticos e influenciar na diversidade da comunidade fúngica presente nestes ambientes.

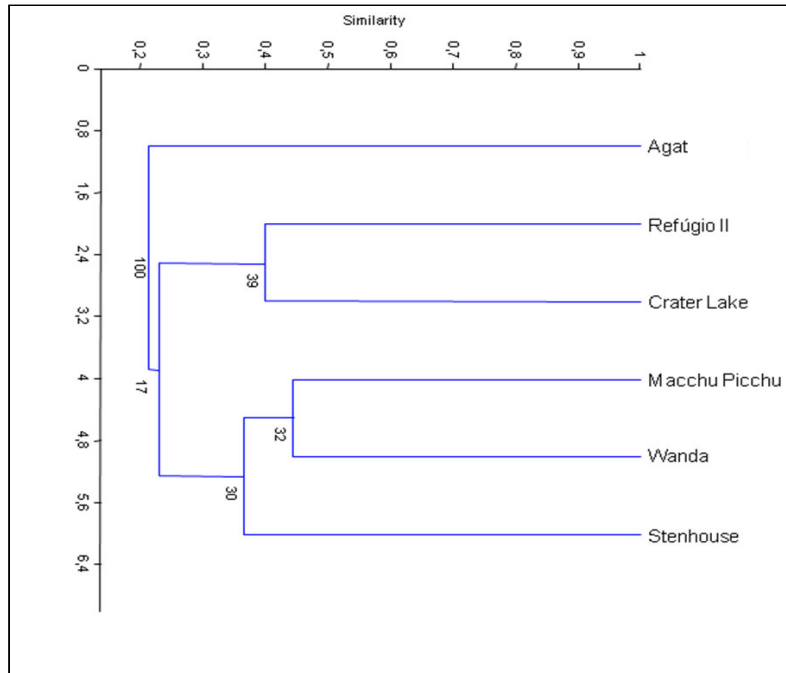
Tabela 3: Localização geográfica, contagem de fungos totais, índices de diversidade e características físico-químicas dos lagos amostrados.

	Lagos amostrados					
	Stenhouse	Macchu Picchu	Refuge II	Wanda	Agat	Crater Lake
Coordenadas	62°04'221" S 58°22'228" W	62°05' S 58°19' W	62°04'088" S 58°25'055" W	62°04'762" S 58°19'505" W	62°11'892" S 58°26'484" W	62°57'S 60°38'W
Shannon (H')	2,34 (2,22/2,81)*	2,03 (1,83/2,58)	2,16 (2,12/2,76)	1,87 (1,85/2,58)	2,03 (1,69/2,45)	1,74 (1,87/2,63)
Simpson (1-D)	0,88 (0,85/0,93)	0,82 (0,79/0,92)	0,82 (0,84/0,93)	0,82 (0,80/0,91)	0,84 (0,78/0,91)	0,79 (0,80/0,91)
Contagens totais (UFC/L)	26,18	28,16	54,0	6,5	10,33	62,0
Temperatura (°C)	0,22	0,72	4,22	1,82	2,18	6,16
Condutividade (mS/cm)	0,15	3,7	0,11	26,4	22,37	0,97
Sólidos totais dissolvidos (g/L)	0,15	4,47	0,11	30,2	25,78	0,98
Salinidade (ppt)	0,11	3,7	0,08	29,17	24,5	0,76
Oxigênio dissolvido (mg/L)	1,01	11,23	31,46	24,92	-	56,45
pH	9,16	7,18	8,5	7,4	7,52	7,92
Potencial oxi-redução (mV)	132,5	194,71	193,56	227,14	204	204,74
Clorofila (µg/L)	3,0	3,13	1,36	1,63	3,4	0,78

\*Os números entre parênteses representam os menores e maiores valores de diversidade, respectivamente. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições.



(A)



(B)

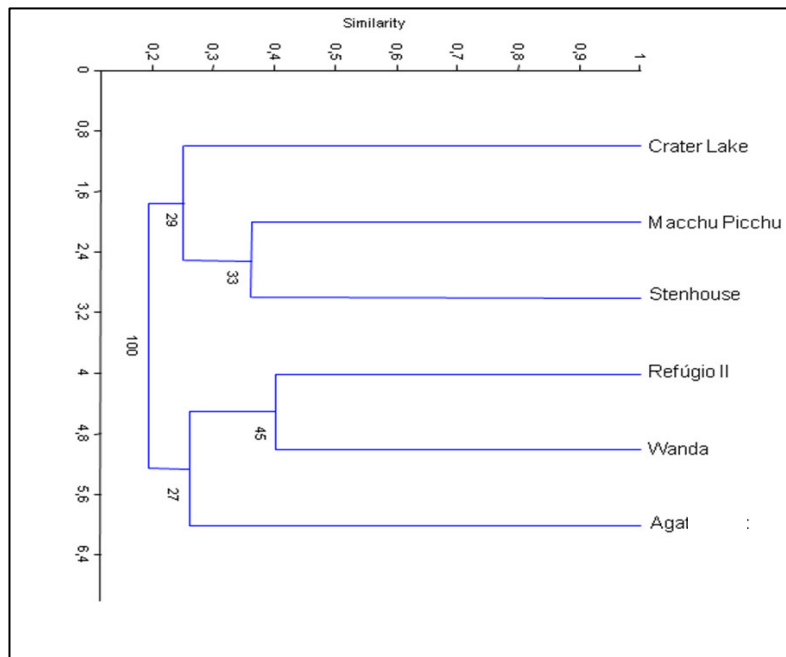


Figura 7: Dendrogramas ilustrando o perfil de similaridade apresentado pelos índices de Sorensen (A) e de Bray-Curtis (B) das comunidades de fúngicas dos seis lagos amostrados na Antártica. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições.

#### 5.4 Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos metanólicos

Todos os isolados de fungos filamentosos coletados e identificados neste estudo e as leveduras identificadas por Brandão (2010) foram cultivadas para produção de extratos metanólicos para os testes biológicos. Um total de 220 extratos fúngicos foram produzidos [128 (58%) produzidos por fungos filamentosos e 92 (42%) obtidos a partir de leveduras] (Figura 08).

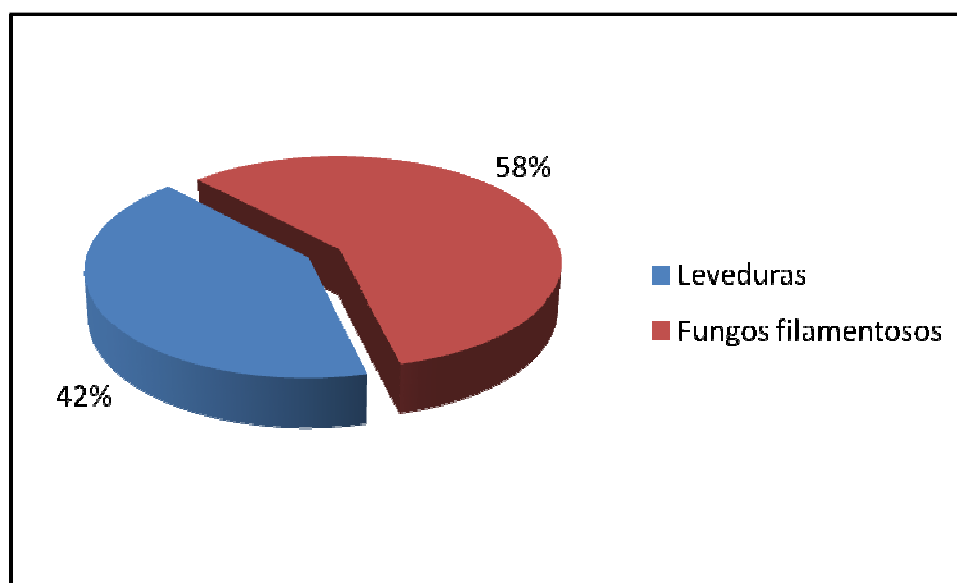


Figura 8: Total de extratos fúngicos produzidos a partir de leveduras e fungos filamentosos isolados de seis lagos antárticos.

A utilização de técnicas de fermentação em meio sólido (*Solid State Fermentation* - SSF) oferece algumas vantagens no crescimento microbiano para a busca de substâncias bioativas, como aumento da produtividade de extratos, facilidade na obtenção dos metabólitos produzidos, redução da energia gasta no processo, além do maior rendimento dos metabólitos secundários (BARRIOS-GONZÁLEZ & MEJIA, 1996; BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2005). A morfologia filamentosa dos fungos e a sua habilidade em sintetizar diferentes metabólitos extracelulares tornam o processo de fermentação em substrato sólido uma alternativa promissora para o cultivo de fungos e obtenção de metabólitos biotativos. No presente trabalho, todos os fungos foram cultivados em meio sólido (BDA) para a obtenção dos extratos. Com a fermentação em meio sólido, foi possível diminuir o

tempo de cultivo para a produção dos extratos dos fungos. O rendimento dos extratos fúngicos variou de 5 a 120 mg e foi suficiente para a realização de todos os ensaios propostos.

O processo de produção de extratos brutos de microrganismos constitui uma importante etapa na detecção de substâncias bioativas para utilização em ensaios de triagem. Em relação ao tipo de solventes utilizado no processo de obtenção dos metabólitos secundários existem algumas variações. Diversos solventes com diferentes polaridades são utilizados para extração dos metabólitos secundários bioativos. Tem-se registrado na literatura o uso de solventes como, acetato de etila (ATALLA *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2003 e 2010; WANG *et al.*, 2006), diclorometano (FERNANDES *et al.*, 2009) e metanol (BRUNATI *et al.*, 2009; VAZ *et al.*, 2009). No presente estudo, o solvente utilizado para a obtenção de metabólitos secundários foi o metanol, que possui afinidade por moléculas de baixo e médio peso molecular devido a sua polaridade, além de possuir um poder de penetração satisfatório nos meios de cultura sólido.

## **5.5 Determinação da atividade antifúngica**

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de conhecer a diversidade microbiana das comunidades na Antártica e isolar microrganismos com alguma atividade biológica. Muitos destes trabalhos de triagem foram realizados a partir do isolamento de bactérias e cianobactérias (NICHOLS *et al.*, 1999; TATON *et al.*, 2006; BIONDI *et al.*, 2008, ROJAS *et al.*, 2009). Todavia, poucos trabalhos de bioprospecção de metabólitos bioativos foram realizados a partir da comunidade fúngica na Antártica (MARINELLI *et al.*, 2004 e BRUNATI *et al.*, 2009). No presente estudo, os extratos dos fungos obtidos de lagos antárticos foram solubilizados e testados para atividade antifúngica na concentração de 250 µg/mL. De acordo com Scorzoni *et al.* (2007), testes de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando extratos vegetais com concentrações a partir de 250 µg/mL, são considerados satisfatórios em trabalhos de bioprospecção. No presente estudo, os extratos que apresentaram inibição do crescimento dos fungos alvos igual ou maior que 70% foram considerados promissores como candidatos a detecção de metabólitos bioativos; os extratos que apresentaram inibição do

crescimento fúngico entre 50 e 69% foram considerados medianamente promissores; e aqueles com valores de inibição inferior a 50% foram considerados não promissores. Extratos brutos podem representar uma mistura de diversas substâncias em diferentes proporções. Desta forma, os extratos considerados medianamente promissores podem possuir substâncias que em menores concentrações não são capazes de apresentar inibição  $\geq 70\%$  sobre os fungos alvos.

O método de microdiluição foi previamente utilizado para determinar a concentração inibitória mínima e confirmar o perfil de sensibilidade e resistência das linhagens de *C. albicans* utilizadas frente ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B. A concentração dos antifúngicos variou de 0,125 a 64  $\mu\text{g/mL}$  para o fluconazol e, 0,031 a 16  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol e a anfotericina B. As linhagens de *C. albicans* 2.1A e 15.3C são resistentes a itraconazol e fluconazol, respectivamente; e a linhagem de *C. albicans* ATCC 18804 é sensível a todos os antifúngicos testados. O método de microdiluição também foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima em relação ao isolado *P. brasiliensis* (Pb 18), e este foi sensível ao antifúngico itraconazol.

Todos os extratos produzidos (220) foram testados frente ao crescimento das linhagens de *C. albicans* e do fungo patogênico *P. brasiliensis*. No entanto, 50 extratos testados contra *P. brasiliensis* estavam contaminados com bactérias e os ensaios serão repetidos posteriormente. Dessa forma, os resultados estatísticos dos ensaios com esse microrganismo alvo serão apresentados separadamente.

As espécies oportunistas do gênero *Candida* são ubíquas, podendo viver como microrganismos comensais em indivíduos saudáveis, e possuem capacidade de causar infecção caso exista alguma condição predisponente relativa ao hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 2010). A candidose oral é a lesão bucal mais comum relatada em pacientes com AIDS (SATANA *et al.*, 2010). Dos 220 extratos produzidos e testados, 19 (8,64%) foram considerados promissores, pois foram capazes de inibir 70% ou mais do crescimento de pelo menos uma linhagem de *C. albicans* (Figura 9A). Estes extratos foram todos obtidos a partir do crescimento de fungos filamentosos. Nenhum extrato proveniente de levedura foi considerado promissor. Cento e quarenta e sete (66,81%) extratos foram considerados medianamente promissores, pois apresentaram valores de inibição entre 50 e 69% contra pelo menos uma linhagem de *C. albicans*; destes, 74 (50,4%) foram obtidos a

partir do crescimento de leveduras e 73 (49,6%) obtidos a partir de fungos filamentosos. A maior parte dos extratos bioativos foi capaz de inibir a linhagem de *C. albicans* 2.1A, que é resistente ao antifúngico itraconazol. Cento e quarenta e um extratos foram considerados promissores e medianamente promissores para a linhagem de *C. albicans* 2.1A (Figura 9C). Para as outras linhagens de *C. albicans* (ATCC 18804 e 15.3C), os extratos promissores e medianamente promissores totalizaram 40 e 128, respectivamente. Nenhum extrato foi considerado promissor em relação à inibição da linhagem de *C. albicans* ATCC 18804. Para a linhagem de *C. albicans* 15.3C (resistente ao antifúngico fluconazol), 10 (4,54%) extratos foram considerados promissores; e 118 (53,63%) medianamente promissores. Entre as três linhagens de *C. albicans* utilizadas nos testes de microdiluição, tanto nos ensaios com extratos de fungos filamentosos, quanto nos ensaios com extratos de leveduras, a linhagem de *C. albicans* ATCC 18804 foi a mais resistente, apesar de ter se mostrado sensível a todos os antifúngicos comerciais testados.

Em relação ao fungo *P. brasiliensis* (Figura 9B), 14 extratos (8,2%) foram considerados promissores; entre estes, 3 (21,4%) foram obtidos a partir do cultivo de leveduras e 11 (78,6%) do cultivo de fungos filamentosos. O número de extratos considerados medianamente promissores e não promissores foi 8 (4,7%) e 148 (87,1%), respectivamente. Dos extratos considerados medianamente promissores, 2 (25%) foram obtidos a partir de leveduras e 6 (75%) foram obtidos a partir do crescimento de fungos filamentosos. O fungo dimórfico *P. brasiliensis* é responsável pela doença endêmica paracoccidioidomicose (PCM) que afeta pelo menos 10 milhões de pessoas na América do Sul e Central (BRUMMER *et al.*, 1993). O longo período de tratamento necessário na PCM somado com a alta taxa de desistência do tratamento, a toxicidade dos fármacos disponíveis e o aumento da incidência de recidivas em pacientes imunocomprometidos, tornam a paracoccidioidomicose um sério problema de saúde pública em vários países da América Latina (TRAVASSOS *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2009; JOHANN *et al.*, 2010). Portanto, os extratos fungicos obtidos no presente trabalho podem servir como fonte de novos metabolitos capazes de inibir o crescimento deste fungo patogênico.

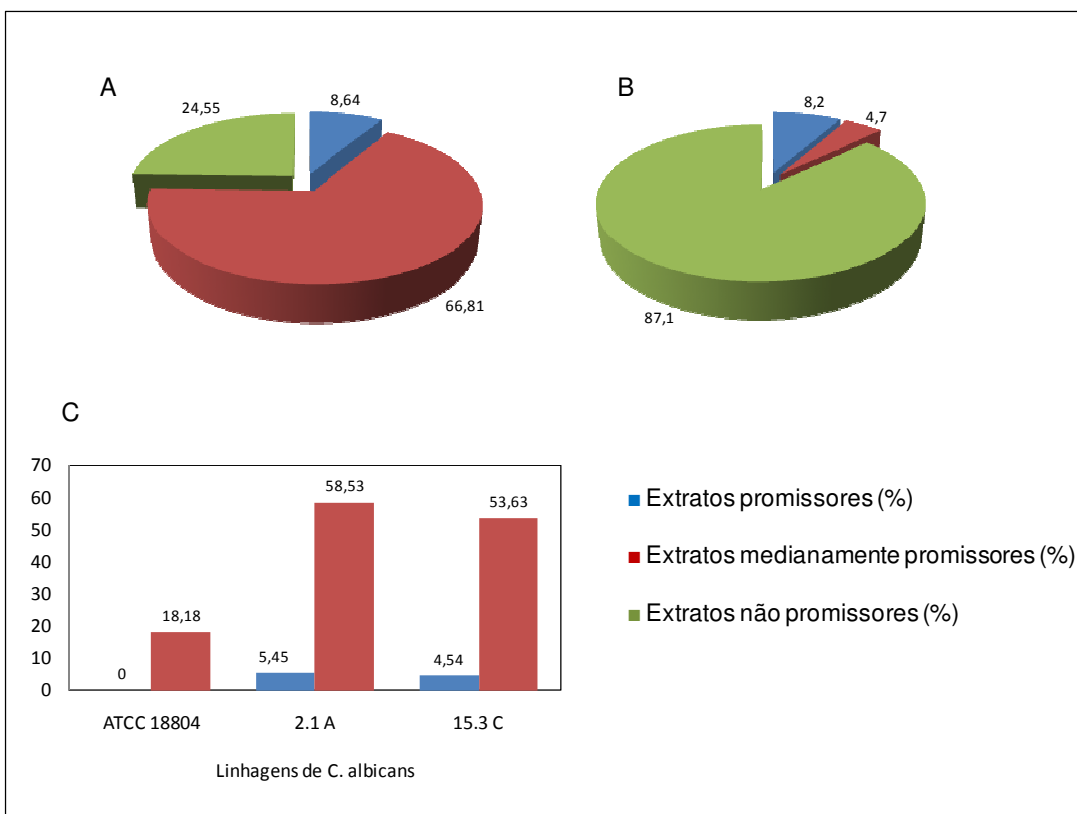


Figura 9: Porcentagem dos extratos fúngicos testados considerados promissores (inibição  $\geq 70\%$ ), medianamente promissores (inibição entre 50 e 69%) e não promissores (inibição  $< 50\%$ ), frente ao crescimento de linhagens clínicas de *Candida albicans* e do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. A: Avaliação da inibição frente ao crescimento de pelo menos uma linhagem de *C. albicans*. B: Avaliação da inibição frente ao crescimento de *P. brasiliensis*. C: Porcentagem de extratos considerados promissores e medianamente promissores em relação a cada linhagem de *C. albicans* testada.

Em relação ao perfil de inibição dos fungos isolados de cada lago (Figura 10), as porcentagens dos extratos considerados promissores variaram de 0 a 16,98%. Nenhum extrato obtido do lago Agat foi capaz de inibir 70% ou mais as linhagens de *C. albicans*. Os fungos obtidos do lago Stenhouse apresentaram o maior número de extratos promissores (9). Em relação aos extratos considerados medianamente promissores, as porcentagens variaram de 21 (51,21%) extratos obtidos do lago Refúgio II a 23 (79,31%) extratos de fungos isolados do lago Wanda. Em contrapartida, o maior número de extratos com inibição abaixo de 50% dos microrganismos alvos foi obtido de fungos do lago Agat (11 extratos- 37,93%).

Nos ensaios com o fungo patogênico *P. brasiliensis* (Figura 11), a porcentagem dos extratos considerados promissores variou de 5 a 11,42%; o lago Agat apresentou o menor número de isolados fúngicos (1) capazes de inibir 70% ou mais o crescimento de *P. brasiliensis*. Em contrapartida, os extratos obtidos de fungos isolados do lago Macchu Picchu tiveram o maior número daqueles considerados como promissores (4). A maior porcentagem de extratos considerados medianamente promissores foi obtida dos fungos isolados do lago Stenhouse (quatro extratos -10,52%). A maior porcentagem de extratos não promissores foi observada para os fungos isolados do lago Agat (19 extratos - 95%).

De uma maneira geral, os resultados dos ensaios biológicos realizados com as linhagens clínicas de *C. albicans* e com o fungo patogênico *P. brasiliensis* apresentaram como principal diferença os percentuais de extratos medianamente promissores e de não promissores. Com as linhagens de *C. albicans*, a maior parte dos extratos foi considerada medianamente promissora. Enquanto que, nos ensaios com o fungo *P. brasiliensis*, a maior parte dos extratos foi considerada não promissora. Essa diferença pode ser explicada pelo maior número de ensaios realizados com a espécie de *C. albicans*, uma vez que foram utilizadas três linhagens com distintos perfis de sensibilidade. No entanto, isto também pode estar relacionado com uma maior resistência do isolado *P. brasiliensis* em relação aos extratos fúngicos testados.

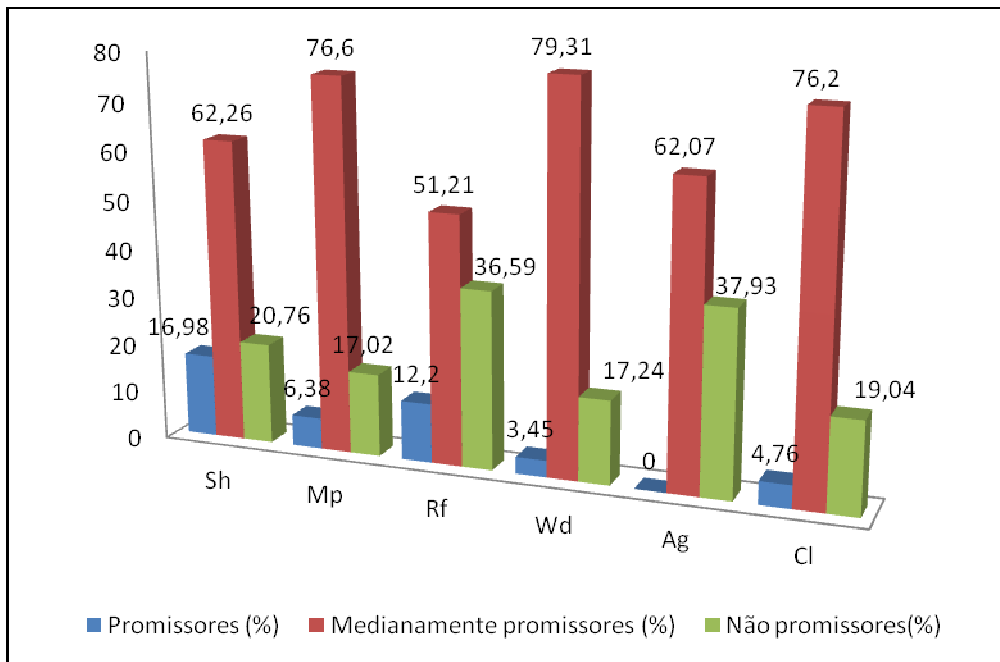


Figura 10: Porcentagem de extratos fúngicos promissores, medianamente promissores e não promissores frente ao crescimento das linhagens de *Candida albicans*, obtidos dos fungos isolados de cada lago estudado. Lagos: Sh = Stenhouse, Mp = Macchu Picchu, Rf = Refúgio II, Wd = Wanda, Ag = Agat e Cl = Crater Lake.

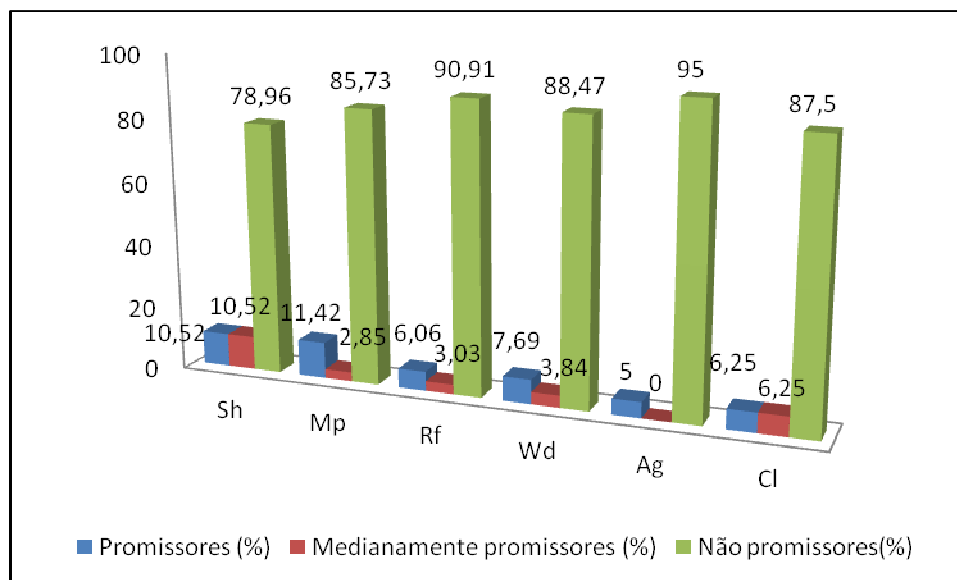


Figura 11: Porcentagem de extratos fúngicos promissores, medianamente promissores e não promissores frente ao crescimento de *Paracocidioides brasiliensis*, obtidos dos fungos isolados de cada lago estudado. Lagos: Sh =



Stenhouse, Mp = Macchu Picchu, Rf = Refúgio II, Wd = Wanda, Ag = Agat e Cl = Crater Lake.

Os isolados de fungos testados com atividade inibitória  $\geq 70\%$  contra pelo menos uma linhagem de *C. albicans* ou contra o fungo *P. brasiliensis* estão listados na Tabela 4. Do total de extratos testados para todos os alvos, 31 foram ativos (Tabela 4), sendo apenas quatro (12,90%) originados de leveduras. Os isolados de leveduras que apresentaram atividade biológica foram identificados como *Cryptococcus victoriae*, *Exophiala heteromorpha*, *Leucosporidiella muscorum* e *Rhodotorula* sp. Os táxons *Rhodotorula* sp. (isolado SH-1.13), *E. heteromorpha* (isolado MP-2.16) e *C. victoriae* (isolado CL-5.3C) inibiram o crescimento do fungo *P. brasiliensis* em 100%. *Cr. victoriae* é conhecida como uma levedura Antártica psicrófila e foi a espécie isolada com maior frequência de amostras de rizosfera de *D. Antarctica*, solo ornitogênico, sedimento marinho e água de lagos antárticos por Vaz e cols (2011).

Os isolados de fungos filamentosos que apresentaram atividade biológica estão distribuídos entre os gêneros *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Microdochium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudeurotium* e *Thelebolus*. Os extratos que apresentaram inibição frente ao crescimento de pelo menos uma linhagem de *C. albicans* totalizaram 48,38% (15). Dos nove gêneros que apresentaram atividade biológica, sete (*Antarctomyces*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Microdochium*, *Mortierella*, *Penicillium* e *Thelebolus*) foram responsáveis pela inibição do crescimento de pelo menos uma linhagem de *C. albicans*, sendo que os valores de inibição variaram entre 70 a 76%. Além destes gêneros, o táxon *Pyronemataceae* (UFMGCB 3694) apresentou 70% e 73% de inibição das linhagens de *C. albicans* 2.1A e 15.3C, respectivamente. O isolado UFMGCB 3770 apresentou 72% de inibição da linhagem de *C. albicans* 2.1A, no entanto não foi possível identificá-lo em nível de espécie até o momento.

Os extratos de fungos filamentosos que apresentaram inibição frente ao crescimento de *P. brasiliensis* totalizaram 40,74% (11 extratos). Os táxons que apresentaram atividade inibitória sobre o fungo *P. brasiliensis* Pb 18 foram: *Antarctomyces psychrotrophicus* (UFMGCB 3782), *Cadophora malorum* (UFMGCB 3771 e UFMGCB 3762), *Geomyces* sp. (UFMGCB 3772) e *Geomyces pannorum* (UFMGCB 3676 e UFMGCB 3769), *Mortierella* sp. (UFMGCB 3680 e UFMGCB

3746) *Mortierella alpina* (UFMGCB 3662 e UFMGCB 3689) e *Pseudeurotium* sp. (UFMGCB 3756). Koyama e cols (2007) isolaram da cultura de *M. alpina* uma nova substância, denominada calpinactam, que apresentou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos filamentosos e leveduras. Algumas substâncias com atividade antifúngica obtidas a partir do extrato bruto do fungo *Fusarium* sp. foram isoladas por Campos *et al.* (2010). Após fracionamento do extrato do fungo endofítico (que apresentou atividade contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum*, *C. albicans* e *P. brasiliensis*), os autores isolaram as micotoxinas, T2-Toxina e uma mistura das substâncias 8-n-butililneosolaniol e 8-isobutililsolaniol, capazes de inibir diferentes amostras clínicas de *P. brasiliensis*. Estes resultados mostraram que as substâncias isoladas de fungos podem ser o ponto de partida para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da PCM.

Dos gêneros encontrados entre os isolados de fungos que apresentaram extratos ativos, *Geomyces* foi encontrado em maior número (7 extratos-22,58%), sendo os isolados identificados como *G. pannorum*. Espécies do gênero *Geomyces*, isoladas de sedimento de lagos antárticos, também apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* (MY1055) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112 e MY2062) (BRUNATI *et al.*, 2009). Brunatti e cols (2009) observaram que, apesar do gênero *Thelebolus* ter sido o mais abundante em amostras de sedimento de lagos antárticos, foi um dos gêneros que apresentou a menor porcentagem de inibição (15%) nos ensaios antimicrobianos realizados. Estes autores mostraram que os gêneros que apresentaram o maior número de isolados com atividade antimicrobiana foram *Penicillium* e *Cladosporium*. No presente estudo, o segundo gênero encontrado com maior número de extratos com atividade nos ensaios realizados foi *Mortierella* (5 extratos\_16,12%). Os gêneros *Penicillium* e *Cladosporium* apresentaram 9,67% e 3,22% de extratos com atividade antifúngica, respectivamente (Tabela 4).

## 5.6 Determinação da atividade antitumoral e antiparasitária

Todos os ensaios realizados contra *L. amazonensis* e células tumorais humanas foram realizados com os extratos fúngicos na concentração de 20 µg/mL.

Foram considerados ativos aqueles extratos com atividade inibitória  $\geq 70\%$  sobre o crescimento de *L. amazonensis* e  $\geq 60\%$  sobre a proliferação de células tumorais (Tabela 4).

Em relação aos ensaios com as formas amastigotas de *L. amazonensis*, nenhum extrato foi capaz de inibir a proliferação das células deste parasita em pelo menos 70%. A média dos valores de inibição para os extratos de fungos filamentosos foi de 21%, sendo o valor mais baixo zero e a maior porcentagem de inibição 64%. A média dos valores de inibição para os extratos de leveduras foi 26% e os valores mais baixos e mais altos foram zero e 64%, respectivamente. A leishmaniose em humanos é causada por 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e aproximadamente 400 mil novos casos dessa doença são detectados anualmente; estima-se que 350 milhões de habitantes estejam em risco de infecção no mundo (WHO, 2005). Entre os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose encontram-se antimoniais pentavalentes que apresentam graves efeitos colaterais (BERMAN, 1997). A elevada toxicidade dos fármacos comercializados, aliada ao aparecimento de formas resistentes de *Leishmania*, aumenta a necessidade de buscar novas substâncias leishmanicidas mais eficazes e menos tóxicas. Ainda que nenhum extrato tenha apresentado atividade inibitória  $\geq 70\%$ , aqueles extratos que apresentaram atividade de 64% podem conter metabólitos bioativos, em baixas concentrações (metabólitos minoritários). Dessa forma, a obtenção de extratos fúngicos capazes de inibir este parasita é de extrema importância, pois estudos voltados para a purificação das substâncias bioativas destes extratos poderão ser conduzidos, e estas poderão ser utilizadas como protótipos de novas drogas com ação leishmanicida.

No presente estudo, todos os extratos foram testados frente à capacidade de inibir a proliferação da linhagem de célula tumoral humana renal (TK-10). Apenas a levedura SH-3.20, identificada como *Leucosporidiella muscorum*, isolada do lago Stenhouse, apresentou atividade citotóxica frente a linhagem TK-10 (69% de inibição) (Tabela 4). A média dos valores de inibição para os extratos provenientes de fungos filamentosos foi de 0,32%, sendo o valor mais baixo zero e a maior porcentagem de inibição 31%. A média dos valores de inibição para os extratos provenientes de leveduras foi 9,67%. As porcentagens de inibição celular variaram entre zero e 69%. Para a linhagem de célula tumoral humana de câncer de mama (MCF-7), 90 (40,9%) extratos foram submetidos ao ensaio biológico. O restante dos

ensaios encontra-se em andamento. Até o momento, apenas o extrato do fungo filamentosso identificado como *Penicillium* sp (UFMGCB 3764) apresentou atividade inibitória de 60% contra a linhagem de MCF-7 (Tabela 4). A média dos valores encontrados para os resultados dos ensaios realizados foi de 3,88%, sendo que a variação da porcentagem de inibição foi de zero a 60%. Brunatti e cols (2009) obtiveram 160 fungos filamentosos isolados de sedimentos de lagos antárticos, dos quais foram produzidos 1.422 extratos e estes foram testados em ensaios antimicrobianos e citotóxico. Os autores consideraram citotóxicos aqueles extratos capazes de inibir em 40% a absorção de timidina celular de células preditivas de câncer de colo de útero humano. Diferentemente do presente estudo, a proporção de extratos considerados citotóxicos foi de dois terços dos extratos testados. Entretanto, vale ressaltar a diferença do critério de avaliação da inibição dos extratos, que pode ter influenciado no número de extratos considerados citotóxicos. Em relação aos dois terços dos extratos considerados citotóxicos, também estavam presentes algumas espécies do gênero *Penicillium*, assim como no presente trabalho. O câncer é um dos principais problemas de saúde no mundo, com mais de 10 milhões de novos casos diagnosticados e cerca de seis milhões de mortes estimadas em 2000 (PARKIN *et al.*, 2000 e 2002). Neste contexto, os extratos dos táxons *Penicillium* sp. e *L. muscorum* que apresentaram atividade inibitória sobre as linhagens de células tumorais humanas merecem destaque e podem constituir importantes fontes para o isolamento das substâncias bioativas, que poderão ser utilizadas como protótipos para novas drogas anticâncer.

Em relação aos fungos ativos que foram identificados em nível de espécie, sete fungos filamentosos apresentaram atividade inibitória contra *C. albicans* e *P. brasiliensis* e três espécies de leveduras contra a linhagem de célula tumoral (TK-10) e *P. brasiliensis* (Tabela 4). Estes dados indicam que apesar do número de extratos considerados ativos ser baixo, estes podem ser promissores em estudos futuros de isolamento e caracterização das substâncias com atividade biológica.

Tabela 4: Fungos isolados de lagos antárticos capazes de inibir pelos menos um dos alvos usados nos ensaios biológicos.

Código do isolado (UFMG)*	Identificação	Lago	Alvos- porcentagem de inibição (%)						
			MCF-7 <sup>a</sup>	TK-10 <sup>b</sup>	LA <sup>c</sup>	ATCC 18804 <sup>d</sup>	2.1A <sup>d</sup>	15.3C <sup>d</sup>	Pb 18 <sup>e</sup>
CB 3672	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	Stenhouse	-	0	5	64	68	<b>70</b>	0
CB 3677	<i>Cladosporium</i> sp.		-	0	6	49	61	<b>70</b>	8
CB 3676	<i>Geomyces pannorum</i>		-	0	5	66	68	<b>73</b>	<b>100</b>
CB 3695	<i>Geomyces pannorum</i>		-	0	6	29	<b>71</b>	39	50
CB 3673	<i>Geomyces pannorum</i>		-	0	6	68	69	<b>74</b>	57
CB 3662	<i>Mortierella alpina</i>		-	0	0	53	42	63	<b>84</b>
CB 3689	<i>Mortierella alpina</i>		-	0	5	45	48	54	<b>100</b>
CB 3694	<i>Pyronemataceae</i>		-	0	2	51	<b>70</b>	<b>73</b>	-
CB 3693	<i>Thelebolus microsporus</i>		-	0	4	54	67	<b>70</b>	-
SH-1-13	<i>Rhodotorula</i> sp.		13	0	34	39	30	61	<b>100</b>
SH-3.20	<i>Leucosporidiella muscorum</i>		32	<b>69</b>	26	48	62	46	0
CB 3771	<i>Cadophora malorum</i>	Macchu	0	0	33	7	48	24	<b>74</b>
CB 3772	<i>Geomyces</i> sp.	Picchu	0	0	12	25	57	38	<b>99</b>
CB 3712	<i>Geomyces pannorum</i>		-	0	1	58	<b>71</b>	62	21
CB 3769	<i>Geomyces pannorum</i>		0	0	31	35	62	36	<b>100</b>
CB 3770	Não identificado		0	0	37	56	<b>72</b>	59	0
CB 3776	<i>Thelebolus</i> sp.		0	0	26	50	<b>74</b>	57	13
MP-2.16	<i>Exophiala heteromorpha</i>		-	13	9	43	62	67	<b>100</b>
CB 3782	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	Refúgio II	0	0	28	36	60	45	<b>97</b>
CB 3679	<i>Geomyces pannorum</i>		-	0	6	40	<b>70</b>	44	19
CB 3740	<i>Microdochium phragmitis</i>		0	0	37	50	59	<b>72</b>	40
CB 3682	<i>Mortierella</i> sp.		-	0	0	60	49	<b>74</b>	1

CB 3680	<i>Mortierella</i> sp.		-	0	5	54	<b>76</b>	48	<b>100</b>
CB 3742	<i>Thelebolus</i> sp.		0	0	41	59	<b>70</b>	68	-
CB 3746	<i>Mortierella</i> sp.	Wanda	0	0	40	36	19	58	<b>74</b>
CB 3748	<i>Penicillium paneum</i>		0	0	21	54	<b>71</b>	64	15
CB 3756	<i>Pseudeurotium</i> sp.		0	0	24	30	59	47	<b>97</b>
CB 3762	<i>Cadophora malorum</i>	Agat	0	0	36	37	46	31	<b>84</b>
CB 3764	<i>Penicillium</i> sp.		<b>60</b>	11	12	31	51	30	-
CB 3721	<i>Penicillium</i> sp.	Crater Lake	-	0	17	45	<b>70</b>	46	-
CL-5.3C	<i>Cryptococcus victoriae</i>		-	0	26	25	48	56	<b>100</b>
Etoposídeo <sup>f</sup>			71	70					
Anfotericina B <sup>f</sup>					70	100	100	100	
Itraconazol <sup>f</sup>									100

\*UFMG: Coleção de Cultura do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. <sup>a</sup>MCF-7: linhagem de célula tumoral humana de mama; <sup>b</sup>TK-10: linhagem de célula tumoral humana de rins. C: formas amastigotas de *L.amazonensis*; D: linhagens de *C. albicans*; E: *P. brasiliensis*; F: drogas controles; (-): ensaios em andamento. Para os ensaios realizados com os alvos C, D e E, os extratos com atividade inibitória  $\geq 70\%$  foram considerados ativos. Para os ensaios com os alvos A e B, os extratos com atividade inibitória  $\geq 60\%$  foram considerados ativos. Todos os valores em negrito indicam extratos com atividade biológica em pelo menos um dos microrganismos ou células alvos usadas.

## 6. Conclusões

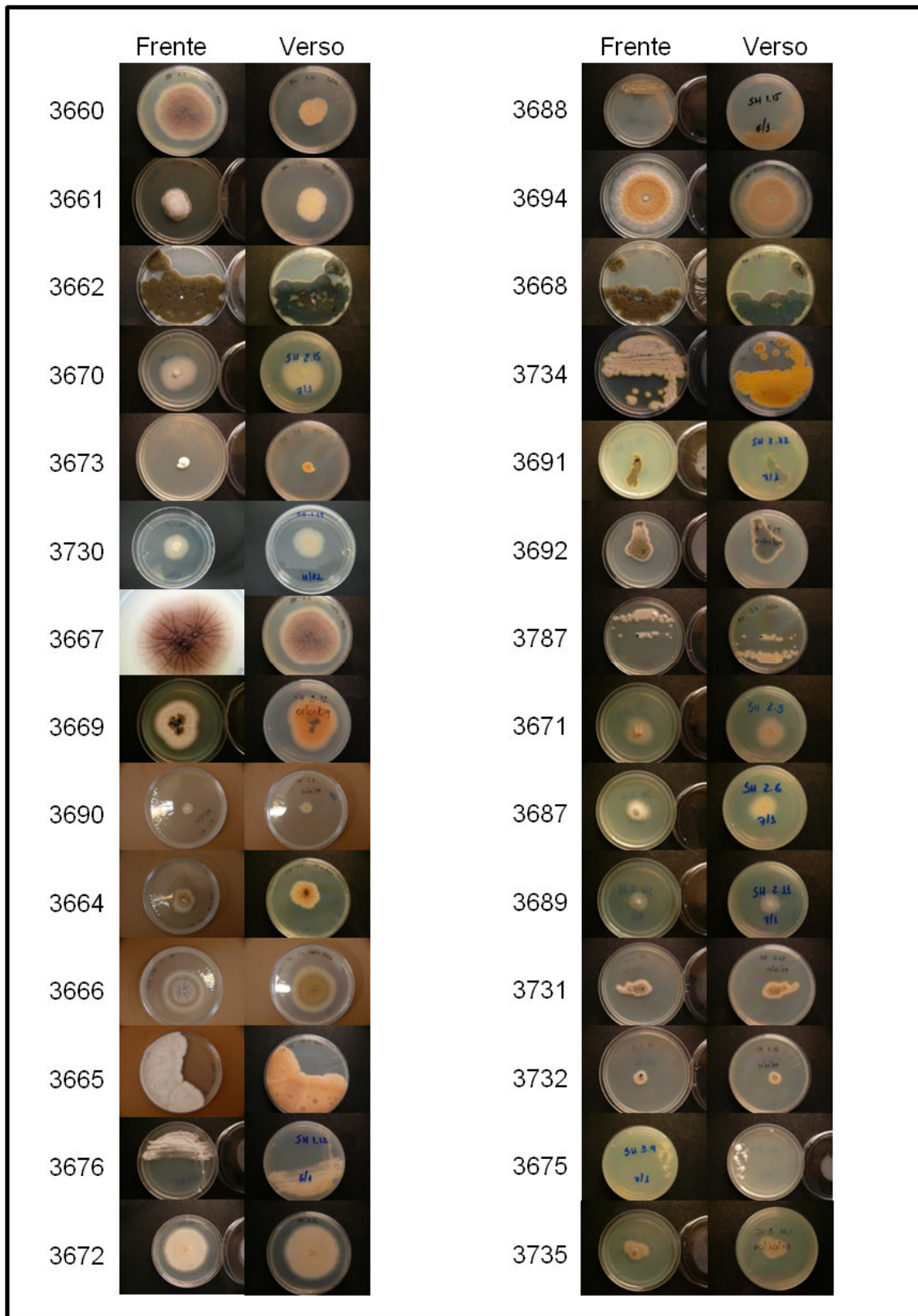
Conhecer a diversidade de fungos presentes na Antártica é de grande importância. Além disso, a comunidade fúngica presente na Antártica pode ser utilizada como fonte de metabólitos secundários com diferentes aplicações biotecnológicas. Desta forma, ainda que este seja um estudo inicial sobre a diversidade e bioprospecção de fungos isolados de lagos antárticos, é possível concluir que:

- O isolamento de fungos filamentosos da água dos lagos estudados mostra que estes ecossistemas antárticos constituem uma rica fonte destes microrganismos; além de reforçar a importância de estudos sobre a riqueza e a equitabilidade dos táxons presentes nestes ambientes.
- Os resultados obtidos mostram que os lagos antárticos constituem uma fonte de espécies cosmopolitas e endêmicas de fungos desta região, sendo a maioria destas compostas por microrganismos psicrófilos e psicrotolerantes.
- A maior diversidade de fungos foi encontrada no lago Stenhouse. Neste local também foi encontrado um maior número de extratos de fungos ativos. Este resultado mostra que este lago pode ser considerado promissor para estudos detalhados quanto à busca de fungos com atividade biológica na Antártica.
- A espécie que apresentou o maior número de extratos com atividade antifúngica foi *Geomyces pannorum*, a qual é considerada endêmica do continente antártico. Este resultado sugere que esta espécie endêmica é fonte promissora de metabólitos bioativos.
- Um maior número de extratos de fungos filamentosos apresentou atividade biológica em relação aos extratos de leveduras testadas nos ensaios realizados. No entanto, todos os extratos de fungos filamentosos e de leveduras que foram ativos podem ser considerados potenciais candidatos a estudos de isolamento e caracterização de substâncias bioativas.
- Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os lagos antárticos podem ser modelos para posteriores estudos ecológicos da comunidade

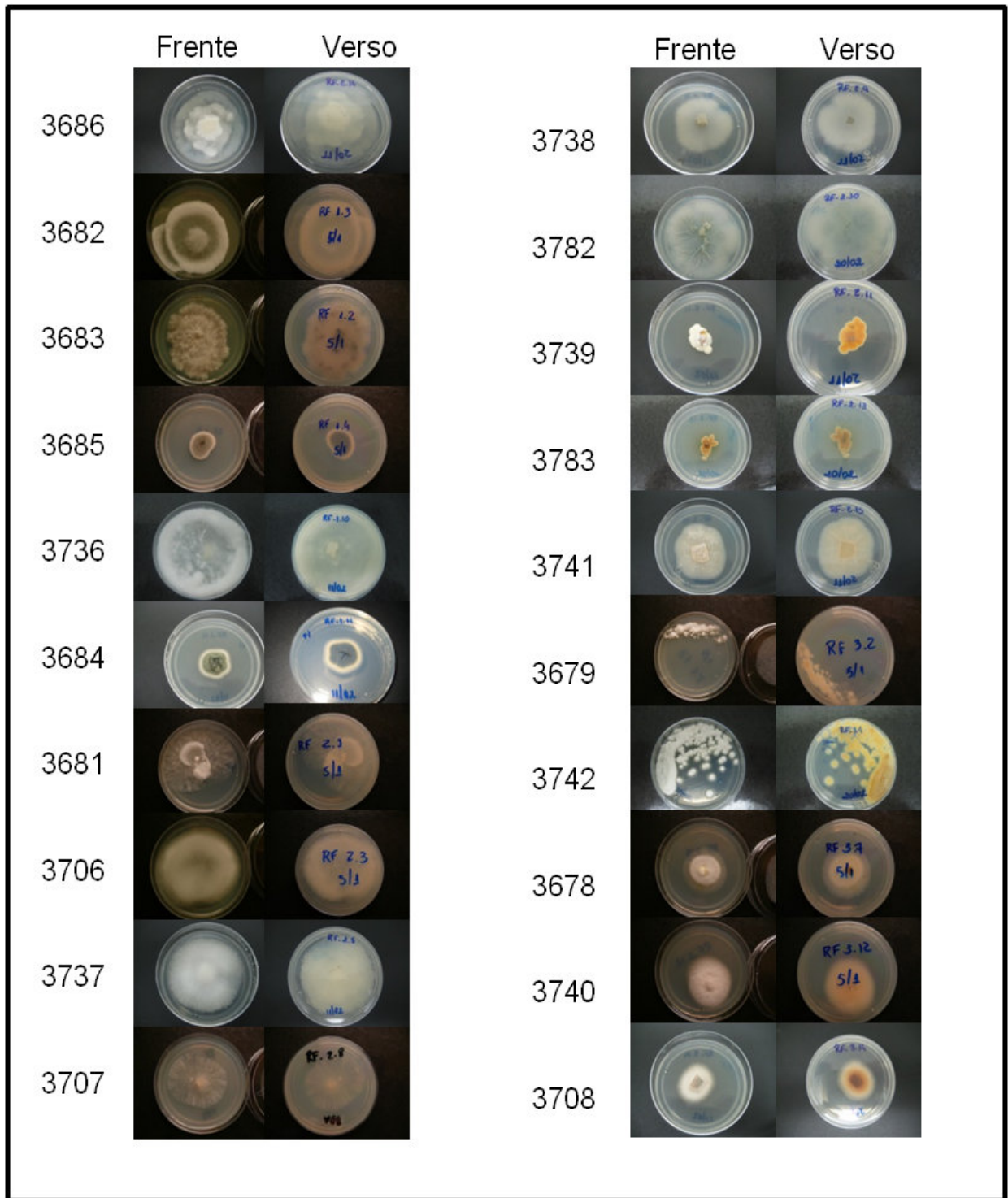
de fungos presentes, a qual está submetida a condições ambientais extremas.



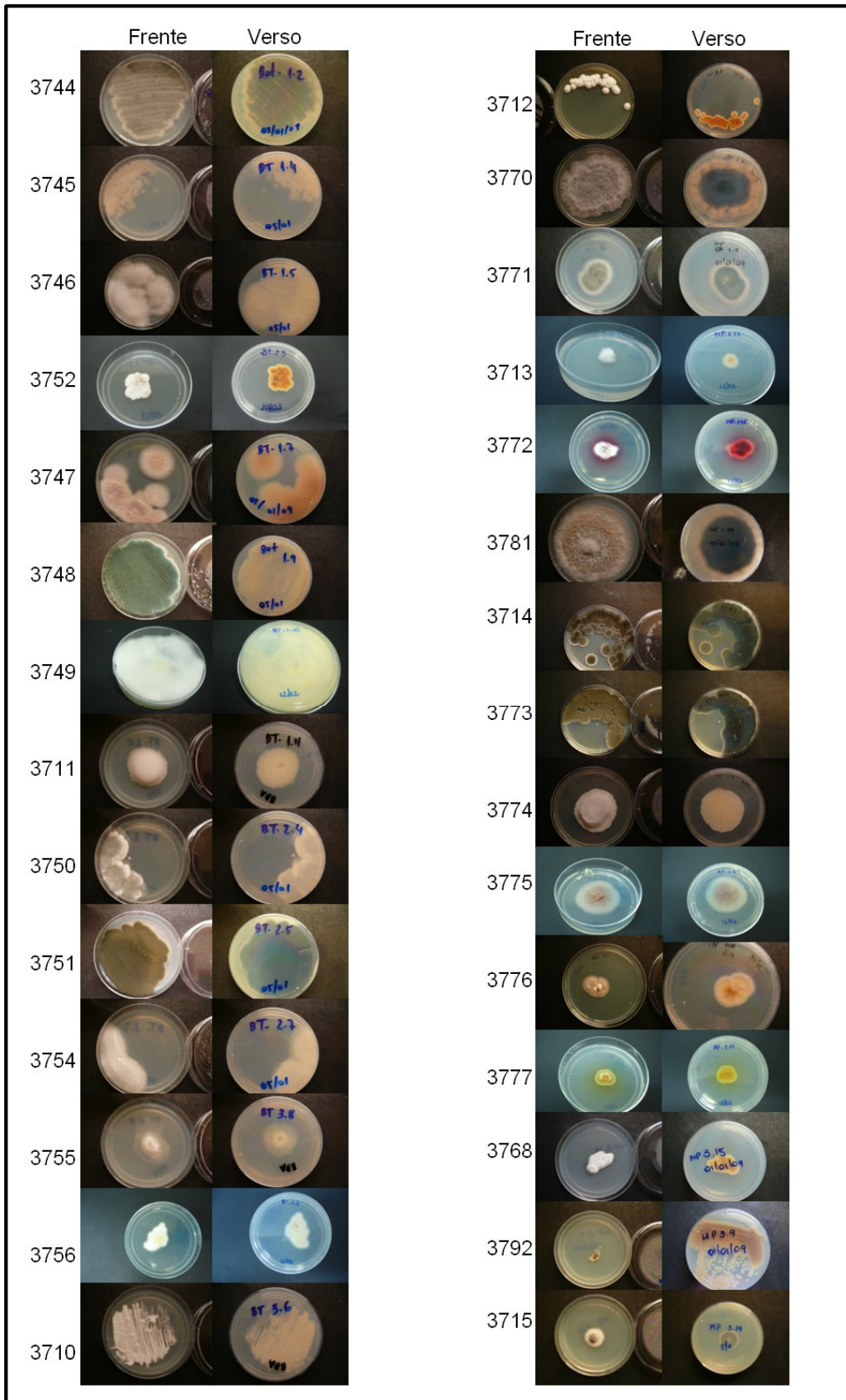
## 7. Anexos



Anexo 1: Morfologia colonial da frente e do verso dos morfotipos do lago Stenhouse, crescidos em Ágar dextrose batata (BDA) a 15°C por 7 dias.

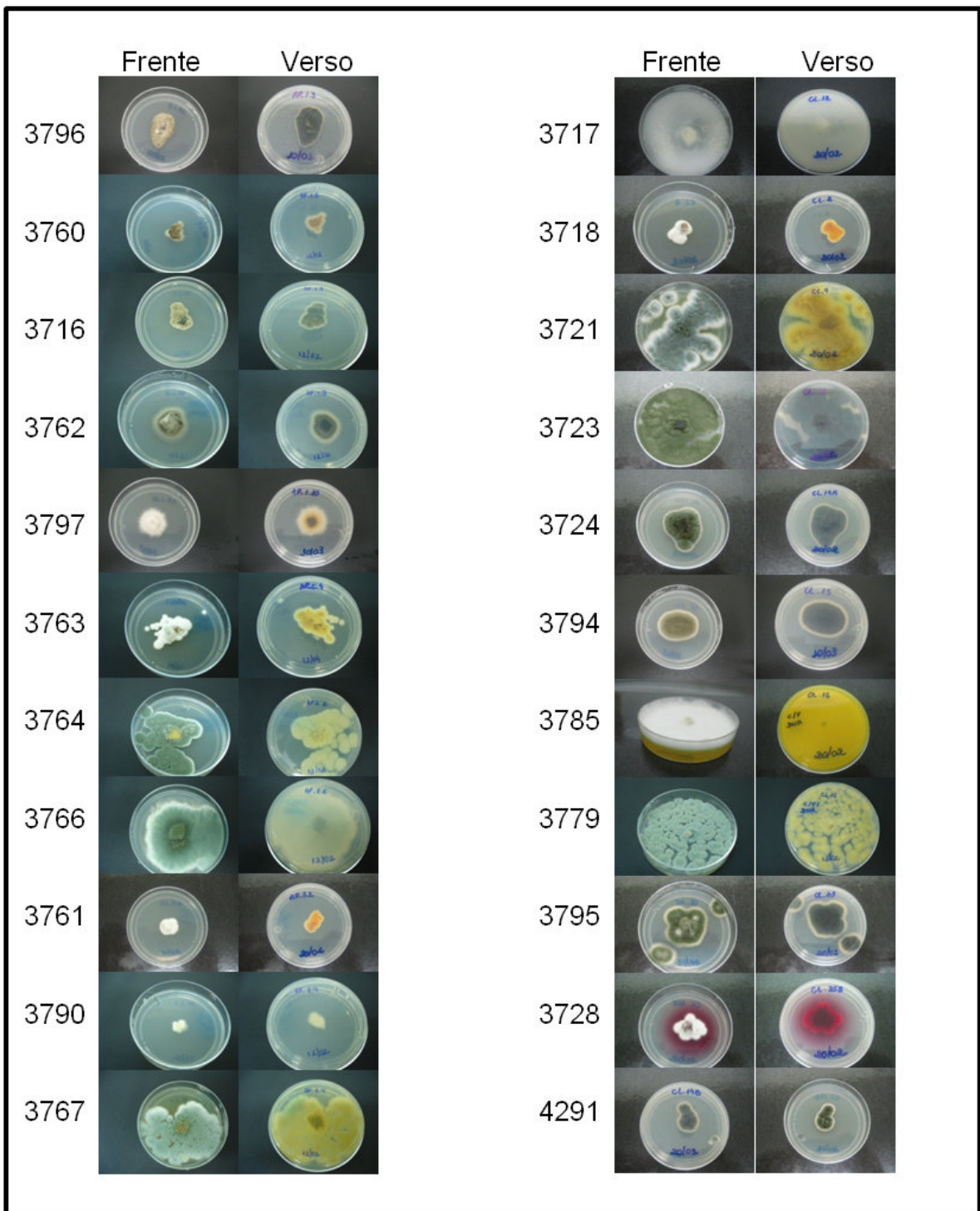


Anexo 2: Morfologia colonial da frente e do verso dos morfotipos do lago Refugio II, crescidos em Ágar dextrose batata (BDA) a 15°C por 7 dias.



Anexo 3: Morfologia colonial da frente e do verso dos morfotipos do lago Wanda (esquerda) e Macchu Picchu (direita), crescidos em Ágar dextrose batata (BDA) a 15°C por 7 dias.





Anexo 4: Morfologia colonial da frente e do verso dos morfotipos do lago Agat (esquerda) e *Crater Lake* (direita), crescidos em Ágar dextrose batata (BDA) a 15°C por 7 dias.

## 8. Referências bibliográficas

ADAMS, B. J.; BARDGETT, R. D.; AYRES, E.; WALL, D. H.; AISLABIE, J.; BAMFORTH, S.; BARGAGLIF, R.; CARYG, C.; CAVACINI, P.; CONNELLI, L.; CONVEY, P.; FELLK, J. W.; FRATIL, F.; HOGGM, I. D.; NEWSHAM, K. K.; O'DONNELL, A.; RUSSELLO, N.; SEPPELTP, R. D.; STEVENS, M. I. Diversity and distribution of Victoria Land biota. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 3003-3018, 2006.

AFAST-EUCAST - Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Rodríguez-Tudela, J. L.; BARCHIESI, F.; BILLE, J.; CHRYSANTHOU, E.; CUENCA-ESTELLA, M.; DENNING, D.; DONNELLY, J. P.; DUPONT, B.; FEGELER, W.; MOORE, C.; RICHARDSON, M.; VERWEIJ, P. E. Method for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 9, p. 1-8, 2002.

AMATO, P.; DOYLE, S.; CHRISTNER, B. C.. Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 589-596, 2009.

AN, K.-D.; KIYUNA, T.; KIGAWA, R.; SANO, C.; MIURA, S.; SUGIYAMA, J. The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 579-592, 2009.

ARENZ, B. E.; HELDA, B. W.; JURGENSA, J. A.; FARRELL, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 3057-3064, 2006.

- ARENZ, B. E. & BLANCHETTE R. A. Investigations of fungal diversity in wooden structures and soils at historic sites on the Antarctic Peninsula. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 46-56, 2009.
- ATALLA, M. M.; KHEIRALLA, Z. H.; HAMED, E. R.; YOUSSEF, A. A.; ABD, A. A. Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 14-24, 2008.
- ATCC-<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=18804&Template=fungiYeast>. Último acesso em 04 de fevereiro de 2011.
- AVESKAMP, M. M.; GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J. H. C.; VERKLEY, G. J. M.; CROUS, P. W. Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, v. 65, p. 1-60, 2010.
- AZMI, O. R. & SEPPELT, R. D. Fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture media on the growth of selected microfungi. **Polar Biology**, v. 18, p. 128-134, 1997.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. & MEJÍA, A. Production of secondary metabolites by solid state fermentation. **Biotechnology Annual Review**, v. 2, p. 83-121, 1996.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; FERNÁNDEZ, F. J.; TOMASINI, A.; MEJÍA, A. Secondary metabolites production by solid-state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 1-6, 2005.
- BAUBLIS, J. A.; WHARTON, R. A. J.; VOLZ, P. A. Diversity of micro-fungi in an Antarctic dry valley. **Journal of Basic Microbiology**, v. 31, p. 11-20, 1991.

- BECQUEVORT, S.; DUMONT, I.; TISON, J.-L.; LANNUZEL, D. SAUVÉE, M.-L.; CHOU, L.; SCHOEMANN, V. Biogeochemistry and microbial community composition in sea ice and underlying seawater off East Antarctica during early spring . **Polar Biology**, v. 32, p. 879-895, 2009.
- BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58 (1), p. 1-26, 2005.
- BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Disease**, v. 24, p. 684-703, 1997.
- BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; TATON, A.; WILMOTTE, A.; HODGSON, D. A.; LOSI, D.; MARINELLI, F. Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 105-115, 2008.
- BIRGISSON, H.; DELGADO, O.; GARCIA, L.; ARROYO, R.; MATTIASSON, B. Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases. **Extremophiles**, v. 7, p. 185-193, 2003.
- BLANCHETTE, R. A.; HELD, B. W.; JURGENS, J. A.; MCNEW, D. L.; HARRINGTON, T. C.; DUNCAN, S. M.; FARRELL, R. L. Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1328-1335, 2004.
- BLANCHETTE, R. A.; HELD, B. W.; Arenz, B. E.; JURGENS, J. A.; BALTES N. J.; DUNCAN, S. M.; FARRELL, R. L. An Antarctic Hot Spot for Fungi at Shackleton's Historic Hut on Cape Royds. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 29-38, 2010.
- BRANDÃO, L. R. Diversidade, distribuição e ocorrência de leveduras isoladas de lagos antárticos, lagos andinos da patagônia Argentina e lagos tropicais

brasileiros. Belo Horizonte. Departamento de Microbiologia da UFMG, 2010. (Tese de Doutorado).

BRIDGE, P. D. & NEWSHAM K. K. Soil fungal community composition at Mars Oasis, a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. **Fungal Ecology**, p. 66-74, 2009.

BRIZZIO, S.; TURCHETTI, B.; DE GARCIA, V.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; VAN BROOCK, M. Extracellular enzymatic activities (EEA) of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 519-525, 2007.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. **Paracoccidioidomycosis: na update. Clinical Microbiology**, v. 6, p. 89-117. 1993.

BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine Genomics**, v. 2, p. 43-50, 2009.

BURGAUD, G.; CALVEZ, T. L.; ARZUR, D.; VANDENKOORNHUYSE, P.; BARBIER, G. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. **Environmental Microbiology**, v. 11, p.1588-1600, 2009.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigota system for frug screening. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p. 818-822, 1997.

CAMPOS, F. F.; JOHANN, S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M. A.; ROSA, L. H.; CALIGIORNE, R. B.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Antifungal activity of trichothecenes from *Fusarium* sp. against clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**, v. p. 1-8, 2010.



- CASTELLANI A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, v. 42, p.181-184, 1967.
- CHIN, Y.-W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. **The Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8 (2), p. 239-253, 2006.
- CONNELL, L.; REDMANC, R.; CRAIGA, S.; RODRIGUEZB, R. Distribution and abundance of fungi in the soils of Taylor Valley, Antarctica. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 3083-3094, 2006.
- COWAN, D. A. & TOW, L. A. Endangered Antarctic Environments. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 649-690, 2004.
- DALSGAARD, P. W.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G.; FRISVAD, J. C.; CHRISTOPHERSEN, C. Psychrophilin B and C: cyclic nitropeptides from the psychrotolerant fungus *Penicillium rivulum*. **Journal Natural Products**, v, 68, p. 258-261, 2005.
- DALSGAARD, P. W.; LARSEN, T. O.; FRYDENVANG, K.; CHRISTOPHERSEN, C. Psychrophilin A and cycloaspeptide D, novel cyclic peptides from the psychrotolerant fungus *Penicillium ribeum*. **Journal Natural Products**, v. 67, p. 878-881, 2004.
- D'AMICO, S.; CLAVERIE, P.; COLLINS, T.; GEORLETTE, D.; GRATIA, E.; HOYOUX, A.; MEUWIS, M. A.; FELLER, G.; GERDAY, C. Molecular basis of cold adaptation. **Philosophy Transactions Royal Society Biology Science**, v. 357, p. 917-925, 2002.
- DE GARCIA, V.; BRIZZIO, S.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; VAN BROOCK, M. Biodiversity of cold adapted yeasts from glacial meltwater Rivers in

- Patagonia, Argentina. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology**, v. 59, p. 331-341, 2007.
- DE HOOG, S. Fungi of the Antarctic: evolution under extreme conditions. **Studies in Mycology**, v. 51, p. vii, 2005.
- DE HOOG, G.S.; GÖTTLICH, E.; PLATAS, G.; GENILLOUD, O.; LEOTTA, G.; VAN BRUMMELEN, J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Mycology**, v. 51, p. 33-76, 2005.
- DEL FRATE, G. & CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic material. **Polar Biology**, v. 11, p. 1-07, 1990.
- DEMING, J. W. Psychrophiles and polar regions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 301-309, 2002.
- ELLIS-EVANS, J. C. Fungi from maritime Antarctic freshwater environments. **British Antarctic Survey**, v. 68, p. 37-45, 1985.
- ELLIS-EVANS, J. C. Microbial diversity and function in Antarctic freshwater ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, p. 1395-1431, 1996.
- ESTEVEZ, F. A. Oxigênio dissolvido. **Fundamentos de Limnologia**, Interciência. FINEP, p. 141-165, 1998.
- FERNANDES, M. R. V.; SILVA, T. A. C.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; HEINRICH, T. A.; ALENCAR, S. M.; LIMA, M. A.; IKEGAKI, M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 677-685, 2009.
- FOGHT, J.; AISLABIE, J. S.; BROWN, T. C. E.; RYBURN, J.; SAUL, D. J.; LAWSON, W. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 329-340, 2004.

- GABLER, I. G. Prevalência de espécies de *Candida* oportunistas em pacientes portadores de AIDS, paracoccidioidomicose e tuberculose com presença e ausência de candidoses bucais. Belo Horizonte. Departamento de Microbiologia da UFMG, 2008. (Tese de Doutorado).
- GABLER, I. G.; BARBOSA, A. C.; VILELA, R. R.; LYON, S.; ROSA, C. A. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brasil. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, p. 247-250, 2008.
- GOCHEVA, Y. G.; KRUMOVA, E. T.; SLOKOSKA, L. S.; MITEVA, J. G.; VASSILEV, S. V.; ANGELOVA, M. B. Cell response of Antarctic and temperate strains of *Penicillium* spp. to different growth temperature. **Mycological research**, v. 110, p. 1347-1354, 2006.
- GOCHEVA, Y. G.; TOSI, S.; KRUMOVA, E. T.; SLOKOSKA, L. S.; MITEVA, J. G.; VASSILEV, S. V.; ANGELOVA, M. B. Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctica. **Extremophiles**, v. 13, p. 273-281, 2009.
- GOMES, J.; GOMES I.; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. **Extremophiles**, v.4, p. 227-235, 2000.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; SONJAK, S.; ZALAR, P.; FRISVAD, J. C.; DIDERICHSEN, B.; PLEMENITAS, A. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 28, p. 1.273-1.278, 2003.
- HUGHES, K. A.; LAWLEY, B.; NEWSHAM, K. K. Solar UV-B Radiation Inhibits the Growth of Antarctic Terrestrial Fungi. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1488-1491, 2003.

**ILHA DECEPTION** - Disponível em [www.deceptionisland.aq/climate.php](http://www.deceptionisland.aq/climate.php) Último acesso em 10 de setembro de 2009.

JOHANN, S.; PEREIRA, N. A. S.; LIMA, L. A. R. S.; CISALPINO, P. S.; COTA, B. B.; ALVEZ, T. M. A.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 9-30, 2010.

KANSOH, A. L.; KHATTAB, O. H.; ABD-ELRAZEK, Z. M.; MOTAWEA, H. M. Broad Spectrum Antimicrobial Agent from a Local Isolate of Marine Fungus Strain. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 6, p. 580-588, 2010.

KOBAYASHI, R.; SAMEJIMA, Y.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K.; UDAGAWA, S. Studies on fungal products. XI: Isolation and structures of novel cyclic pentapeptides from *Aspergillus* sp. NE-45. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 1347-1352, 1987.

KOGEJ, T.; CENE, G.; VOLKMANN, M.; GORBUSHINA, A. A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines in Extremophilic Fungi - Novel Complementary Osmolytes? **Environmental Chemistry**, v. 3, p. 105-110, 2006.

KOSTADINOVA, N.; KRUMOVA, E.; TOSI, S.; PASHOVA; ANGELOVA, M. Isolation and identification of filamentous fungi from Island Livingston, Antarctica. **Biotechnology & biotechnological**, v. 23, p. 267-270, 2009.

KOYAMA, N.; KOJIMA, S.; NONAKA, K.; MASUMA, R.; MATSUMOTO, M.; ŌMURA, S.; TOMODA, H. Calpinactam, a new anti-mycobacterial agent, produced by *Mortierella alpina* FKI-4905. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 183-186, 2010.

LEBAR, M. D.; HEIMBEGNER, J. L.; BAKER, B. J. Cold-water marine natural products. **Natural Products Report**, v 24: 774-797, 2007.

- LECLERC, M. C.; GUILLOT, J.; DEVILLE, M. Taxonomic and phylogenetic analysis of *Saprolegniaceae* (*Oomycetes*) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 369-377, 2000.
- LLAMES, M. E.; VINOCUR, A. Phytoplankton structure and dynamics in a volcanic lake in Deception Island (South Shetland Islands, Antarctica). **Polar Biology**, v. 30, p. 849-857, 2007.
- LIBKIND, D.; SOMMARUGAB, R.; ZAGARESEC, H.; VAN BROOCK, M. Mycosporines in carotenogenic yeasts. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 749-754, 2005.
- LOPEZ, G.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; PEDRÓZ ALIÓ, C.; MOREIRA, D. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. **Nature**, v. 409, p. 603-606, 2001.
- LOQUE, C. P.; MEDEIROS, A. O.; PELLIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, E. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, p. 641-648, 2010.
- MAHUKU, G. S.; HSIANG, T.; YANG, L. Genetic diversity of *Microdochium nivale* isolates from turfgrass. **Mycological research**, v. 5, p. 559-567, 1998.
- MARGESIN, R.; FONTEYNE, P. A.; SCHINNER, F.; SAMPAIO, J. P. Novel psychrophilic basidiomycetous yeast species from alpine environments: *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov., and *Rhodotorula glacialis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2179-2184, 2007.
- MARGESIN, R. Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. **Extremophiles**, v. 13, p. 257-262, 2009.

MARINELLI, F.; BRUNATI, M.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; VAN TRAPPEN, S.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; ROJAS, J. L.; GENILLOUD, O. Biotechnological exploitation of heterotrophic bacteria and filamentous fungi isolated from benthic mats of Antarctic lakes. **Microbial Genetic Resources and Biodiscovery**, p. 163-184. 2004.

MCRAE, C. F. & SEPPELT, R. D. Filamentous fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. **Polar Biology**, v. 22, p. 389-394, 1999.

MCRAE, C. F.; HOCKING, A. D.; SEPPELT, R. D. *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. **Polar Biology**, v. 21, p. 97-111, 1999.

MERCANTINI, R.; MARSELLA, R.; CERVELLATI, M. C. Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil. **Mycopathologia**, v. 106, p. 47-52, 1989.

NCBI - Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Último acesso em 10 de janeiro de 2011.

NICHOLS, D.; BOWMAN, J.; SANDERSON, K.; NICHOLS, C. M.; LEWIS, T.; TOM M.; NICHOLS, P. D. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 240-246, 1999.

OARG A. Life in extreme environments. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 9, p. 1-10, 2009.

ONOFRI, S.; ZUCCONI, L.; SELBMANN, L.; TOSI, S.; BARRECA, D.; RUISI, S.; FENICE, M. Studies on Antarctic fungi. **Polarnet Technical Report. Scientific And Technical Report Series**, p. 49-52, 2005.

- ONOFRI, S. A.; SELBMANN, L. A.; DE HOOG, G. S. B, GRUBE, M. C.; BARRECA, D. A.; RUISI, S. A.; ZUCCONI, L. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v. 40, p.1657-1664, 2007.
- PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA S. S. Cancer burden in the year 2000: the global picture. **Europe Journal of Cancer**, v. 37, p. 4-66. 2001.
- PARKIN, D. M.; WHELAN, S.; FERLAY, J.; TEPPON, L.; THOMAS, D. B. Cancer incidence in five continents. **IARC Science Publications**, v. 8, p. 1-781, 2002.
- PEARCE, D. A. Antarctic subglacial lake exploration: a new frontier in microbial ecology. **Journal of the International Society for Microbial Ecology**, v. 3, p. 877-880, 2009.
- PITT, J. I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **Academic Press**, London. 1979.
- PRIDDLE, J.; HEYWOOD, R. B. Evolution of Antarctic lake ecosystems. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 14, p. 51-66, 1980.
- RASPOR, P. & ZUPAN, J. Yeasts in extreme environments. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, **The Yeast Handbook**, first edn, p. 371-418. Edited by C. A. Rosa & G. Peter. Heidelberg: Springer, 2006.
- RAY, M. K.; DEVI, K. U.; KUMAR, G. S.; SHIVAJI, S. Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1918-1923, 1992.
- RIBEIRO, A. S.; SILVA, D. A.; SILVA, F. P.; SANTOS, G. C.; CAMPOS, L. M. S.; OLIVEIRA, L. V. N.; SANTOS, D. A. Epidemiology and phospholipase activity of oral *Candida* spp. among patients with central nervous system

diseases before and after dental cleaning procedure. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 19-23, 2010

ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v. 151, p. 341-353, 2001.

ROJAS, J. L.; MARTÍN, J.; TORMO, J. R.; VICENTE, F.; BRUNATI, M.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; VAN TRAPPEN, S.; MERGAERT, J.; SWINGS, J.; MARINELLI, F.; GENILLOUD, O. Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Marine Genomics*, v. 2, p. 33-41, 2009.

ROSA, C. A. & PETER, G. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. **Heidelberg: Springer-Verlag**, v. 1. 579 p, 2006.

ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; CAMILA CRISTINA JACOB, MARINA CAPELARI\*\*\*, CARLOS AUGUSTO ROSA\*, CARLOS LEOMAR ZANI. Screening of Brazilian *Basidiomycetes* for Antimicrobial Activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967-974, 2003.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). **Polar Biology**, v 32, p. 161-167, 2009.

ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L. A.; SANTIAGO, I. F.; ROSA, C. A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology**, v. 73, p.178-189, 2010.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, p. 127-141, 2007.



- RUSSO, G.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J. P.; BROOCK, M. V. Levaduras del Río Agrio y El Lago Caviahue, un ambiente acuático ácido de origen volcánico (Neuquén, Argentina). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 41, p. 167-175, 2006.
- RYAN, G. S.; HARPER, D. A. T.; WHALLEY, J. S. PALSTAT, **Statistics for Palaeontologist**. Chapman & Hall, London, 1995.
- SATANA, D.; GENC, G. E.; ERTURAN, Z. The antifungal susceptibilities of oral *Candida* spp. isolates from HIV-infected patients. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 1831-1835, 2010.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **The British Mycology Society**, v. 109, p. 661- 686, 2005.
- SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 391-397, 2007.
- SELBMANN, L.; DE HOOG, G. S.; MAZZAGLIA, A.; FRIEDMANN, E. I.; ONOFRI, S. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. **Studies in Mycology**, v. 51, p. 1-32, 2005.
- SHIVAJI, S.; BHADRA, B.; RAO, R. S.; PRADHAN, S. *Rhodotorula himalayensis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from Roopkund Lake of the Himalayan mountain ranges, Índia. **Extremophiles**, v. 12, p. 375-381, 2008.
- SHIVAJI, S. & PRASAD, G. S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Satyanarayana, T. & Kunze, G. (eds.) v, 2009, p. 3-18, 2009.

- SILVA, I. M. Comparação dos índices de qualidade da água e usos do fator de contaminação e índices de geoacumulação para os sedimentos da microbacia do Arroio João Corrêa, São Leopoldo, RS, Brasil. São Leopoldo. **Programa de Pós Graduação em Geologia da UNISINOS**, 2008. (Tese de Mestrado).
- SIMMONS, G. M.; VESTAL, J. R.; WHARTON, R. A. Environmental regulators of microbial activity in continental Antarctic lakes. **Antarctic Research**, v. 59, p. 165-195, 1993.
- SIMÕES, J. C.; ARIGONY-NETO J.; BREMER U. F. O uso de mapas antárticos em publicações. **Pesquisa Antartica Brasileira**, v. 4, p. 191-197, 2004.
- SINGH, S. M.; PUJA, G.; BHAT, D. J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. **Current Science**, v. 90, p. 1.388-1392, 2006.
- SOGONOV, M. V.; VELIKANOV, L. L. Soil microfungual communities. In: Onipchenko VG, ed. Alpine ecosystems in the Northwest Caucasus. **Dordrecht: Kluwer** p 271- 283, 2004.
- STEFLINGER, K. Temperature and NaCl-tolerance of rock inhabiting meristematic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 271–281, 1998.
- STCHIGEL, A. M.; CANO, J.; MACCORMACK, C. W. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. **Mycological Research**, v.105, p.377-382, 2001.
- STOKES, J. L.; REDMOND, M. L. Quantitative Ecology of Psychrophilic Microorganism. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 74-78, 1966.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

- TATON, A.; GRUBISIC S.; ERTZ, D.; HODGSON, D. A.; PICCARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, F.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 1257-1270, 2006.
- TEIXEIRA, L. C. R. S.; PEIXOTO, R. S.; CURY, J. C.; SUL, W. J.; PELLIZARI, V. H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A. S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **International Society for Microbial Ecology**, v. 4, p. 989-1001, 2010.
- THOMAS-HALL, S.; WATSON, K.; SCORZETTI, G.. *Cryptococcus statzelliae* sp. nov. and three novel strains of *Cryptococcus victoriae*, yeasts isolated from Antarctic soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2.303-2.308, 2002.
- TOSI, S.; CASADO, B.; GERDOL, R.; CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic mosses. **Polar Biology**, v. 25, p. 262-268, 2002.
- TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, p. 251-62, 2008.
- USPON, R.; NEWSHAM, K. K.; BRIDGE, P. D.; PEARCE, D. A.; READ, D.J. Taxonomic affinities of dark septate root endophytes of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*, the two native Antarctic vascular plant species. **Fungal Ecology**, v. 2, p. 184-196, 2009.
- VAN TRAPPEN, S.; VANDECANDELAERE, I.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. *Flavobacterium fryxellicola* sp. nov. and *Flavobacterium psychrolimnae* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, 769-772, 2005.

- VAZ, A. B. M.; MOTA, R. C.; BOMFIM, M. R. Q.; VIEIRA, M. L. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with *Orchidaceae* in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p. 1381-1391, 2009.
- VAZ, A. B. M.; ROSA L. H.; VIEIRA, M. L. A.; GARCIA, V.; BRANDÃO, L. R.; TEIXEIRA, L. C. R. S.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; MARIA, VAN B.; ROSA C. A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective 1 compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2011.
- VINCENT, W. F. Microbial ecosystems of Antarctica. **Cambridge: Cambridge University**, Press, p. 303, 1988.
- VISHNIAC, H.S.. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, p. 1365-1378, 1996.
- VISHNIAC, H. Yeast biodiversity in the Antarctic. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, **The Yeast Handbook**, first edn, p. 419-440. Edited by C. A. Rosa & G. Peter. Heidelberg: Springer, 2006.
- VOLLENWEIDER, R. A.; KEREKES, J. J. Background and summary results of the OECD cooperative program on eutrophication. In restoration of Lakes and Inland Waters, EPA/ v, 10, P. 25-36, 1981.
- WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23, p. 79- 83, 2006.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.

A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WILSON, Z. E. & BRIMBLE, M. A. Molecules derived from the extremes of life. **Natural Product Report**, v. 26, p. 1-140, 2009.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSET-KANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

WHO - <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>. World Health Organization. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. Último acesso em 2005.

WRIGHT, S. W. & BURTON, H. R. The biology of Antarctic saline lakes. **Hydrobiologia**, v. 82, p. 319-338, 1981.

ZHANG, Y.; LIU, S.; LIU, H.; LIU, X.; CHE, Y. Cycloaspeptides F and G, Cyclic Pentapeptides from a Cordyceps-Colonizing Isolate of *Isaria farinosa*. **Journal Natural Products**, v. 72, p. 1364-1367, 2009.