

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

**Fungos em rochas de ecossistemas extremos: taxonomia, diversidade,  
bioprospecção de metabólitos bioativos e uso como modelos em estudo de  
astrobiologia**

Tese 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 doutor em microbiologia.

Vívian Nicolau Gonçalves  
Belo Horizonte  
2015

Vívian Nicolau Gonçalves

**Fungos em rochas de ecossistemas extremos: taxonomia, diversidade,  
bioprospecção de metabólitos bioativos e uso como modelos em estudo de  
astrobiologia**

Tese 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 doutor em microbiologia.

**Orientador**

Dr. Luiz Henrique Rosa. Departamento de Microbiologia, UFMG

**Co-orientadores**

Dr. Carlos Augusto Rosa. Departamento de Microbiologia, UFMG

Dr. Charles L. Cantrell e Dr. David Wedge. USDA-ARS, National Products Utilization Research Unit (NPURU), University, Oxford, MS, EUA

**Belo Horizonte,  
2015**

**Colaboradores:**

Dr. Carlos Leomar Zani e Dr. Tânia Maria de Almeida Alves. Laboratório de Química de Produtos Naturais. Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ/MG.

Dr. Douglas Galante. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron– LNLS/CNPEM.

Dr. Fabio Rodrigues. Departamento de Química Fundamental – USP.

Dr. Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer. Departamento de solos, Universidade Federal de Viçosa, MG.

Dr. Benito Gomez-Silva. Departamento Biomédico do Centro de Biotecnologia e Bioengenharia (CeBiB), Universidade de Antofagasta, Chile.

**Belo Horizonte,**

**2015**

## **Agradecimentos**

A Deus pela oportunidade de vida e por me apresentar infinitas possibilidades de aprender, e evoluir;

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Microbiologia, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade de realizar o trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz H. Rosa pela orientação e pela confiança. Agradeço todas as oportunidades concedidas, os ensinamentos e presença constante. Sua ajuda e amizade foram imprescindíveis não só para o desenvolvimento deste trabalho, como também para o meu crescimento profissional. É um grande privilégio fazer parte da equipe de trabalho de um profissional que confio e admiro;

Ao Prof. Dr. Carlos A. Rosa pela co-orientação. Agradeço as oportunidades que me foram concedidas e todos os ensinamentos;

Ao Dr. David Wedge e Dr. Charles Cantrell pela co-orientação, apoio e orientações imprescindíveis para realização das atividades durante o doutorado sanduíche;

Ao grupo de pesquisa do USDA, em especial aos técnicos Solomon Green III, Amber Callahan, Ramona Pace e Linda Robertson pela paciência, ensinamentos e simpatia;

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

Aos membros da banca examinadora, Viviane Alves Gouveia, Carlos Leomar Zani, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira e Patrícia Faleiro Pimentel, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que serão muito importantes para a melhoria deste trabalho;

Ao Doutor Carlos Zani e a Doutora Tânia M<sup>a</sup> Alves pela colaboração e permissão para utilizar a infra-estrutura do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN);

Ao Dr. Douglas Galante e Dr. Fábio Rodrigues pela colaboração e coleta de rochas realizada no Deserto do Atacama, além de toda ajuda e suporte para realização dos experimentos de astrobiologia;

Ao Dr. Carlos E. G. R. Schaefer pela colaboração e coleta de rochas no continente antártico;

Ao meu querido marido Thiago, por todo amor e companheirismo. Por fazer parte da minha vida e estar sempre presente, apoiando-me e estimulando a crescer e ser sempre melhor.

A minha família querida, agradeço aos meus pais (José Miguel e Tânia) por toda dedicação, apoio e amor, incondicionais. Vocês são meus exemplos de vida e fazem parte de mais uma etapa. As minhas irmãs, Virgínia e Raquel, por todos os momentos que passamos juntas, dividindo alegrias e risadas e por toda amizade e cumplicidade. A todos os familiares e amigos pela torcida;

Aos amigos do laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos (LSBF) e Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos pelos bons momentos que compartilhamos e pelo apoio que me deram: Ana Raquel, Bia Borelli, Camila Gontijo, Camila Rodrigues, Carla Lara, Caroline, Débora, Fernanda Paladino, Fran, Gabriela Montandon, Grazi, Iara Santiago, Isabel, Jordanda, Juliana, Laura Esteves, Lana, Letícia, Lívia, Lucas, Luciana Brandão, Mariana Anzai, Mariana Costa, Mariana Rocha, Marina Moura, Marina Perbone, Nívea, Rafael, Raquel Cadete, Soraya, Susana Johann, Thelma e Valéria Godinho. A todos aqueles que passaram pelo laboratório e fizeram parte da minha trajetória. As Curicas e Amizadis pelos encontros, risadas e companheirismo. Além do conhecimento o que fica é a certeza e a saudade de que a rotina foi mais leve pela nossa convivência;

Em especial, à minha irmã gêmea e madrinha 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. A minha companheira do “estrangeiro” Mari Zé, pela paciência e amizade. O sanduíche foi mais leve e divertido. E a minha companheira de extremófilos, Iara. Desejo a vocês todo sucesso!

Ao Hebert pela ajuda nos experimentos! Ainda que tenha sido curto o tempo, foi bastante precioso;

Ao pessoal do NAGE (UFMG), em especial ao Juliano, e LPCM (IRR), em especial Elisângela, por disponibilizarem a infra-estrutura necessária para a realização dos sequenciamentos;

Ao Jamil do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de proteínas pela disposição e ajuda no preparo dos extratos.

Ao Gabriel e André pela paciência e ajuda com os experimentos de astrobiologia.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia;

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

Ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) e INCT Criosfera pelo apoio logístico e financeiro.

Ao RPPN do Santuário do Caraça por ter concedido a licença de coleta.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo bolsa; e ao programa CAPES-REUNI pela oportunidade de adquirir experiência docente;

A Prof. Fátima Noronha por ter sido minha tutora e por dar todo suporte necessário para o bom andamento das atividades relacionadas ao REUNI.

## Sumário

Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
Resumo.....	17
Abstract.....	19
<b>1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1 <i>Micro-organismos extremófilos.....</i>	<i>23</i>
2.2 <i>Adaptações evolutivas dos micro-organismos extremófilos.....</i>	<i>24</i>
2.3 <i>Ecosistemas extremos: Antártica, Deserto do Atacama e Campos de Altitude do Brasil....</i>	<i>26</i>
2.4 <i>Fungos presentes em rochas.....</i>	<i>28</i>
2.5 <i>Metabólitos bioativos de fungos extremófilos.....</i>	<i>30</i>
2.6 <i>Fungos extremófilos: modelos para estudos de astrobiologia.....</i>	<i>32</i>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>35</i>
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>35</i>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
4.1 <i>Áreas de amostragem.....</i>	<i>35</i>
4.1.1 <i>Campo de Altitude na região da Serra do Caraça, MG, Brasil.....</i>	<i>35</i>
4.1.2 <i>Deserto do Atacama, Chile.....</i>	<i>36</i>
4.1.3 <i>Antártica continental.....</i>	<i>36</i>
4.2 <i>Coletas de amostras de rochas.....</i>	<i>37</i>
4.3 <i>Isolamento e preservação de fungos presentes em rochas.....</i>	<i>37</i>
4.4 <i>Identificação dos fungos.....</i>	<i>38</i>
4.4.1 <i>Extração do DNA total.....</i>	<i>39</i>
4.4.1.1 <i>Leveduras.....</i>	<i>39</i>
4.4.1.2 <i>Fungos filamentosos.....</i>	<i>39</i>
4.4.2 <i>Obtenção de amplicons.....</i>	<i>40</i>
4.4.2.1 <i>Amplificação utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>.....</i>	<i>40</i>
4.4.2.2 <i>Amplificação utilizando iniciadores NL-1 e NL-4.....</i>	<i>41</i>
4.4.2.3 <i>Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.....</i>	<i>41</i>
4.4.2.4 <i>Amplificação do fragmento gênico da <math>\beta</math>-tubulina.....</i>	<i>42</i>
4.4.2.5 <i>Amplificação fragmento gênico da RNA polimerase II.....</i>	<i>42</i>
4.4.3 <i>Purificação dos produtos de PCR.....</i>	<i>43</i>
4.4.4 <i>Reação de sequenciamento e precipitação das amostras.....</i>	<i>43</i>
4.4.5 <i>Análise computacional das sequências.....</i>	<i>44</i>

4.4.6	Diversidade da comunidade de fungos: cálculo dos índices de abundância, riqueza, equitabilidade, similaridade e construção de curvas de rarefação .....	44
4.5	<i>Cultivo dos fungos para obtenção dos extratos brutos</i> .....	46
4.5.1	Extratos etanólicos .....	46
4.5.2	Extratos diclorometânicos .....	46
4.5.3	Cultivo em larga escala .....	47
4.6	<i>Ensaio Biológicos</i> .....	48
4.6.1	Triagem da atividade antimicrobiana .....	48
4.6.1.1	Ensaio antimicrobiano contra bactérias e leveduras .....	48
4.6.1.2	Ensaio antimicrobiano contra <i>Cladosporium sphaerospermum</i> .....	49
4.6.1.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	50
4.6.2	Triagem da atividade anticâncer, antiparasitária e antiviral .....	51
4.6.2.1	Ensaio com células tumorais humanas .....	51
4.6.2.2	Ensaio <i>in vitro</i> com a forma amastigota-like de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	51
4.6.2.3	Ensaio <i>in vitro</i> sobre formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	52
4.6.2.4	Ensaio antiviral contra Dengue vírus 2 .....	52
4.6.3	Avaliação da atividade antimicrobiana de frações e substâncias .....	53
4.7	<i>Seleção dos extratos para análise química</i> .....	54
4.8	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	54
4.9	<i>Fracionamento químico biomonitorado</i> .....	54
4.10	<i>Elucidação estrutural dos constituintes químicos</i> .....	55
4.11	<i>Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos</i> .....	55
4.11.1	Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos .....	55
4.11.2	Identificação dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos .....	56
4.11.3	Reação de diazotação – produção de ésteres metílicos dos ácidos graxos .....	56
4.12	<i>Avaliação da resistência a UV-C</i> .....	57
4.13	<i>Avaliação da resistência a UV ambiental</i> .....	58
4.14	<i>Espectroscopia de Raman e avaliação de pigmentos</i> .....	58
4.15	<i>Avaliação da resistência à salinidade</i> .....	59
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	59
5.1	<i>Fungos habitantes de rochas de Campo de Altitude da RPPN do Caraça, Minas Gerais, Brasil</i> .....	60
5.1.1	Amostragem e Isolamento dos fungos .....	60
5.1.2	Identificação e análise da diversidade dos fungos .....	60
5.1.3	Atividade biológica e identificação de metabólitos bioativos .....	76
5.2	<i>Fungos habitantes de rochas do Deserto do Atacama, Chile</i> .....	80
5.2.1	Amostragem e Isolamento dos fungos .....	80
5.2.2	Identificação e análise da diversidade dos fungos .....	80
5.2.3	Atividade biológica, purificação e identificação de metabólitos bioativos .....	94
5.3	<i>Fungos habitantes de rochas da Antártica continental</i> .....	102
5.3.1	Coleta e Isolamento dos fungos .....	102
5.3.2	Identificação e análise da diversidade dos fungos .....	103



5.3.3 Atividade dos extratos com diclorometano e identificação de metabólitos bioativos.....	109
5.3.4 Experimentos de astrobiologia .....	109
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>113</b>
6.1 Coleta e isolamento de fungos .....	113
6.2 Identificação dos fungos .....	114
6.3 Diversidade da comunidade fúngica .....	119
6.4 Atividade biológica, purificação e identificação de metabólitos bioativos .....	120
6.5 Experimentos de astrobiologia .....	123
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>125</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>126</b>
<b>9. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO</b> .....	<b>144</b>
<b>10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	<b>145</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>147</b>
ANEXO A .....	147
ANEXO B .....	148
ANEXO C .....	149
ANEXO D .....	150
ANEXO E .....	151
ANEXO F .....	152

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Estruturas químicas de moléculas isoladas de fungos extremófilos. <sup>1, 2 e 3</sup>Geomicinas (A-C) isoladas de culturas de *Geomyces* sp., com atividades antifúngica e antimicrobiana (LI *et al.*, 2008). <sup>1 e 2</sup>Chetracinas (D e E) ativas contra linhagens de células tumorais humanas isoladas do fungo psicrófilo *Oidiodendron trucatatum* (LI *et al.*, 2012). Metabólitos antibacterianos e citotóxicos (F e G) isolados do fungo *Penicillium brevicompactum* obtido do talo da alga marinha *Pterocladia* sp. (ATALLA *et al.*, 2011). .....32
- Figura 2:** Proporção (%) de isolados fúngicos obtidos nos diferentes meios de cultura utilizados no processamento das amostras de rochas coletadas no Campo de Altitude na região da serra do Caraça.....60
- Figura 3:** Distribuição (%) dos isolados obtidos em nível de classe a partir de rochas do Campo de Altitude na região da serra do Caraça.....62
- Figura 4:** Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) obtidos de rochas de Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo utilizado. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*. .....73
- Figura 5:** Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) obtidos de rochas de Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo utilizado. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da  $\beta$ -tubulina, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.....74
- Figura 6:** Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) obtidos de rochas de Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo utilizado. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da RPB II, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*. .....75
- Figura 7:** Curva de rarefação de táxons (Índice de Mao-Tou) dos fungos obtidos de rochas do Campo de Altitude da RPPN Santuário do Caraça, construída com intervalo de 95% de confiança.....76
- Figura 8:** Proporção (%) de isolados fúngicos obtidos nos diferentes meios de cultura utilizados no processamento das amostras de rochas coletadas no Deserto do Atacama, Chile.....80

<b>Figura 9:</b> Distribuição (%) dos isolados obtidos em nível de classe a partir de rochas do Deserto do Atacama.....	81
<b>Figura 10:</b> Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes no Deserto do Atacama em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, por meio do parâmetro Composto Máximo de <i>Likelihood</i> .....	88
<b>Figura 11:</b> Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes no Deserto do Atacama em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da $\beta$ -tubulina, por meio do parâmetro Composto Máximo de <i>Likelihood</i> .....	89
<b>Figura 12:</b> Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes no Deserto do Atacama em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da RPB II, por meio do parâmetro Composto Máximo de <i>Likelihood</i> .....	90
<b>Figura 13:</b> Curva de rarefação de táxons (Índice de Mao-Tou) dos fungos obtidos de rochas do Deserto do Atacama, construída com intervalo de 95% de confiança. ....	92
<b>Figura 14:</b> Fluxograma ilustrando o processo de fracionamento biomonitorado das substâncias ativas produzidas por <i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 8074. Em negrito, as frações e substâncias ativas.....	99
<b>Figura 15:</b> Proporção (%) dos isolados fúngicos obtidos nos diferentes meios de cultura utilizados no processamento das amostras de rochas coletadas na região de Ellsworth na Antártica continental.....	103
<b>Figura 16:</b> Distribuição (%) dos isolados obtidos em nível de classe a partir de rochas da Antártica continental.....	103
<b>Figura 17:</b> Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes na Antártica continental em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, por meio do parâmetro Composto Máximo de <i>Likelihood</i> .....	106
<b>Figura 18:</b> Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes na Antártica continental em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas	

no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da $\beta$ -tubulina, por meio do parâmetro Composto Máximo de <i>Likelihood</i> .....	107
<b>Figura 19:</b> Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) presentes na Antártica continental em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da RPB II, por meio do parâmetro Composto Máximo de <i>Likelihood</i> . .....	107
<b>Figura 20:</b> Curva de rarefação de táxons (Índice de Mao-Tou) dos fungos obtidos de rochas da Antártica continental, construída com intervalo de 95% de confiança.....	108
<b>Figura 21:</b> Dendrogramas ilustrando o perfil de similaridade apresentado pelos índices de Sorensen (A) e de Bray-Curtis (B) das comunidades de fúngicas dos três locais amostrados. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de <i>bootstrap</i> foram calculados a partir de 1.000 repetições.....	108
<b>Figura 22:</b> Taxa de sobrevivência das leveduras testadas e controles após diferentes doses de radiação UV-C. A sobrevivência é dada pela razão da contagem de UFC/mL após exposição pela contagem de UFC/mL no tempo de exposição igual a 0. Leveduras testes: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> AN6ADG-1 e <i>Debaromyces hansenii</i> AN1AYM-1, AN6AYM-1, AN6AMY-1 e AN8BYM-1. Controle sensível: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742; controle resistente <i>Exophiala</i> sp. S15LV1.....	110
<b>Figura 23:</b> Taxa de sobrevivência da levedura <i>Rhodothorula mucilaginosa</i> AN6ADG-1 após a exposição a diferentes doses de radiação ultravioleta ambiental (UV-A e UV-B). Leveduras controle (sensível: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742; resistente <i>Exophiala</i> sp. S15LV1) apresentadas apenas a critério demonstrativo, visto que foram testadas em condições experimentais distintas. Assim, não se pode fazer uma comparação direta e precisa, apenas aproximada. ....	110
<b>Figura 24:</b> Espectro Raman da levedura <i>Rhodothorula mucilaginosa</i> AN6ADG-1 para detecção de pigmentos fotoprotetores. Os picos mais estreitos indicam, em conjunto, a assinatura característica de carotenóides. A elevação no centro do espectro se deve à fluorescência, uma interferência comum em amostras biológicas causada por matéria orgânica em geral.....	112
<b>Figura 25:</b> Medida indireta do crescimento pela densidade óptica de cultivos da levedura <i>Rhodothorula mucilaginosa</i> AN6ADG-1 em meios de cultura GYMP, com diferentes concentrações de NaCl, até 72 horas de incubação.....	112

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Identificação molecular dos fungos obtidos de rochas do Campo de Altitude na RPPN Santuário do Caraça.....	63
<b>Tabela 2:</b> Atividade dos extratos etanólicos (250 µg/mL) obtidos a partir dos fungos isolados de rochas do Campo de Altitude na RPPN Santuário do Caraça, sobre inibição do crescimento dos microrganismos. ....	78
<b>Tabela 3:</b> Número de amostras coletadas em cada local estudado do Deserto do Atacama e suas respectivas altitudes. ....	80
<b>Tabela 4:</b> Identificação molecular dos fungos obtidos de rochas do Deserto do Atacama....	83
<b>Tabela 5:</b> Táxons obtidos de rochas do Deserto do Atacama distribuídos de acordo com a altitude dos locais de coleta e suas respectivas densidades (UFC/g).....	91
<b>Tabela 6:</b> Índices de diversidade das comunidades de fungos presentes nas rochas do Deserto do Atacama em diferentes altitudes. ....	93
<b>Tabela 7:</b> Atividade dos extratos diclorometânicos obtidos a partir dos fungos isolados de rochas do Deserto do Atacama, sobre inibição dos alvos.....	96
<b>Tabela 8:</b> Atividade antifúngica da fração e substâncias obtidas do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 8074.....	100
<b>Tabela 9:</b> Atividade antibacteriana da fração e substâncias obtidas do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 8074.....	101
<b>Tabela 10:</b> Número de amostras coletadas em cada local estudado da Antártica continental e suas respectivas altitudes.....	102
<b>Tabela 11:</b> Identificação molecular dos fungos obtidos de rochas da Antártica continental. ....	105

## Lista de abreviaturas

AFTS: Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee  
ATCC: American Type Culture Collection  
B: Índice de Bray-Curtis  
BDA: Ágar dextrose batata  
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool  
BLASTn: Nucleotide Basic Locus Alignment Search Tool  
BT2a/BT2b: Iniciadores para amplificação parcial do gene da  $\beta$ -tubulina  
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
CCD: Cromatografia de Camada Delgada  
CIM: Concentração Inibitória Mínima  
CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbônico  
CPqRR/FIOCRUZ: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
DO: densidade óptica  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EUA: Estados Unidos da América  
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
g: grama  
GenBank: Banco de dados de sequências genéticas do NCBI  
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  
ICB: Instituto de Ciências Biológicas  
ITS: Região transcrita interna  
J/m<sup>2</sup>: Joules/metro quadrado  
Km<sup>2</sup>: quilômetros quadrados  
LPCM: Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular  
LQPN: Laboratório de Química de Produtos Naturais  
LSBF: Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos  
M: molar

MCF: Microcolonial  
MCF-7: Célula de adenocarcinoma de mama humano  
MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
mg: miligrama  
mg/L: miligrama/litro  
mg/mL: miligrama/mililitro  
min: Minutos  
mL: Mililitro  
mm: Milímetro  
mM: Milimolar  
MOPS : ácido morfolinepropano sulfônico  
MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico  
µg: Micrograma  
µg/mL: micrograma/mililitro  
µmol: micromol  
µl: Microlitro  
NaCl: Cloreto de sódio  
NAGE: Núcleo de Análise Genômica  
NCBI: National Center for Biotechnology Information  
NCI: National Cancer Institute  
ng: nanograma  
nm: Nanômetro  
P.A.: para análise  
PAST: Palaeontological Statistics  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
pH: potencial hidrogeniônico  
pmol: Pico mol  
PROANTAR: Programa Antártico Brasileiro  
QS: Índice de Sorensen  
q.s.p.: quantidade suficiente para  
rDNA: DNA ribossomal  
REUNI: Reestruturação e Expansão das Universidades Federais  
RPB II: RNA polimerase II  
rRNA: RNA ribossomal  
r.p.m.: Rotações por minuto  
RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Natural

s: Segundo

S: sul

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TBE: Tris borato

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

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFMGCB : Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais

USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

UV: ultravioleta

V: Volts

YM: Ágar extrato de malte-extrato de levedura

W: oeste

W/m<sup>2</sup>: watts/metro quadrado

%: por cento

°C: graus Celsius



## Resumo

Alguns ecossistemas são conhecidos como extremos por apresentar características diferentes daquelas encontradas em ambientes em que a maior parte dos organismos é capaz de sobreviver. A vida nesses ecossistemas muitas vezes é dominada por microorganismos, os quais são conhecidos como extremófilos. Neste contexto, a superfície das rochas é considerada um ecossistema extremo devido às baixas ou elevadas temperaturas, mudanças rápidas na atividade de água e radiação UV elevada. Este estudo teve como objetivo caracterizar as comunidades de fungos associados a rochas presentes em ecossistemas extremos e avaliar sua capacidade em produzir metabólitos bioativos, bem como utilizá-las como modelos para estudos de astrobiologia. Amostras de rochas de Campo de Altitude do Brasil, Deserto do Atacama, Chile e da Antártica continental foram coletadas e processadas. Um grama de rocha de cada amostra foi pulverizado, solubilizado e inoculado em quatro meios de cultura diferentes (YM, MYEA, DG18 e DRBC). Após o processamento foram obtidos um total de 444 isolados fúngicos sendo 292 (255 fungos filamentosos e 37 leveduras) de rochas do Campo de Altitude; 81 fungos filamentosos do Deserto do Atacama; e 71 (54 fungos filamentosos e 17 leveduras) do continente Antártico. A maior parte dos isolados foi identificada como representantes do filo *Ascomycota* e a classe com maior abundância foi *Eurotiomycetes*. O táxon presente em maior abundância no Campo de Altitude foram *Arthrocatena* sp., *Cladophialophora* sp., *Devriesia* sp., *Herpotrichiellaceae* sp., *Neophaeothecoidea* sp., *Paraconiothyrium* sp. 1, *Pezizomycotina* sp. 1, *Pseudotaeniolina* sp. e *Teratosphaeriaceae* sp. Tanto no Deserto do Atacama quanto na Antártica continental, os gêneros *Cladosporium* e *Penicillium* foram obtidos com as maiores densidades, os quais foram os únicos comuns às rochas de todos os ambientes amostrados. Os maiores índices de riqueza (Margalef) e diversidade (Fisher) foram encontrados para a comunidade de fungos de rochas do Campo de Altitude e os menores para comunidade da Antártica continental. Em relação à dominância (Simpson), o menor valor foi encontrado para a comunidade presente nas rochas do continente antártico (0,88), enquanto que as demais comunidades tiveram o mesmo índice (0,96). Por meio dos coeficientes de similaridade (Sorensen e Bray-curtis), as comunidades fúngicas do Deserto do Atacama e da Antártica continental foram as mais similares. Baseado nas densidades dos táxons obtidos por meio de técnicas de cultivo, o esforço amostral realizado em todas as áreas de coletas indicou que foi alcançado a maior parte da diversidade presente nas rochas estudadas. Os fungos obtidos de rochas foram cultivados e seus extratos testados em diferentes ensaios biológicos para detecção de metabólitos com atividade antimicrobiana, antitumoral, antiviral e antiparasitária. Do total de extratos testados, 6,7% foram ativos

contra pelo menos um dos alvos utilizados. O isolado obtido a partir de rochas do Deserto do Atacama, *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074, ativo contra *Candida albicans* (CIM = 62,5 µg/mL) e célula tumoral humana MCF-7, foi selecionado para o fracionamento biomonitorado. Ao final foi identificada a substância ergosterol 5,8-endoperóxido, a qual  
5 apresentou atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus* MRS (CI<sub>50</sub> = 13,74 µg/mL), e os ácidos graxos linoléico e α-linolínico, sendo este último ativo contra *Cryptococcus neoformans* (CIM = 10 µg/mL). A partir dos extratos ativos *Acremonium* sp. UFMGCB 7138 (CIM = 125 µg/mL contra o fungo *Cladosporium shaerospermum*) obtido do Campo de  
10 Altitude do Brasil e *Penicillium* cf. *coffeeae* UFMGCB 100021 (CIM = 125 µg/mL contra *C. albicans*) também foi possível identificar os ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico e linoléico em ambos e pentadecanóico e heptadecanóico apenas em *Acremonium* sp. UFMGCB 7138. Dentre as leveduras obtidas de rochas da Antártica continental, as quais foram testadas nos experimentos de astrobiologia, *Rodothorula mucilaginosa* AN6ADG-1 não apresentou perda substancial da viabilidade, mesmo após a exposição à radiação UV-C  
15 e UV ambiental, bem como em meio de cultura com até 2M de NaCl. A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que este trabalho contribuiu para o conhecimento da comunidade fúngica presente em rochas dos ecossistemas estudados, principalmente considerando o pioneirismo do estudo com amostras do Campo de Altitude do Brasil e do Deserto do Atacama. Os resultados de bioprospecção e o estudo químico de extratos ativos  
20 demonstraram que a comunidade de fungos presentes em rochas dos ecossistemas amostrados pode ser fonte de espécies produtoras de substâncias bioativas. Além disso, dentro dessas comunidades habitantes de rochas de ecossistemas extremos também pode conter fungos modelos eucariotos para os estudos de vida fora do planeta.

## Abstract

Some ecosystems are known as extreme due to different characteristics from those found in environments where most organisms are able to survive. Life in these ecosystems is often dominated by microorganisms, which are called extremophiles. In this condition, the rock surface is often considered an extreme ecosystem due to its high or low temperatures, water activity fast changes and high UV radiation. Thus, this study aimed to evaluate the diversity of the fungal community associated with rocks present in extreme ecosystems, its capability to produce prototypes of bioactive metabolites, and use it as a model for astrobiology studies. Samples of Altitude Field rocks of Brazil, Atacama Desert and continental Antarctica were collected and processed. One rock gram of each sample was pulverized, solubilized and plated on four different culture media (YM, MYEA, DG18 and DRBC). After processing, were obtained a total of 444 fungal isolates, been 292 (255 filamentous fungi and 37 yeasts) of Altitude field rocks, 81 filamentous fungi of the Atacama Desert and 71 (54 filamentous fungi and yeasts 17) of the Antarctic continent. Most of the isolates were identified in the phylum *Ascomycota* and the class with greatest abundance was *Eurotiomycetes*. Taxa present in greater abundance in the Altitude Field of Serra of Caraça were *Arthrocatena* sp., *Cladophialophora* sp., *Devriesia* sp., *Herpotrichiellaceae* sp., *Neophaeothecoidea* sp., *Paraconiothyrium* sp. 1, *Pezizomycotina* sp. 1, *Pseudotaeniolina* sp., *Teratosphaeriaceae* sp.. Both in Atacama Desert and continental Antarctica genus *Cladosporium* and *Penicillium* were isolated with the highest density, which were the only cosmopolitan genera common to all study sites. The greatest scores of richness (Margalef) and diversity (Fisher) were obtained from the community of rock fungi of Altitude field, while the lowest were found in continental Antarctic. Regarding the Simpson index, the lowest value was also found in the community of rocks from Antarctic continent, while other communities had the same index (0.96). Through similarity coefficients (Sorensen and Bray-Curtis), fungal communities of the Atacama Desert and Antarctic continent were the most similar. Considering density of taxa obtained through cultivation techniques, sampling effort carried out in all areas of collections showed to have been sufficient to achieve full diversity in rocks sampled. The fungi obtained from rocks were grown and their crude extracts tested in different biological assays to detect metabolites with antimicrobial, antitumor, antiviral and antiparasitic activity. Of the extracts tested, 6.7% were active against at least one of the targets used. The isolate obtained from Atacama Desert rocks, *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074, active against *Candida albicans* (MIC = 62.5 µg/mL) and tumor cell MCF-7, was selected for bioassay-guided fractionation. At the end were identified the substance ergosterol substance 5,8-endoperoxide, with activity against *Staphylococcus aureus* MRS (IC<sub>50</sub> = 13.74 µg/mL) and

linoleic and  $\alpha$ -linolenic fatty acids, the latter being active against *Cryptococcus neoformans* (MIC = 10  $\mu\text{g/mL}$ ). From the active extracts *Acremonium* sp. UFMGCB 7138 (MIC = 125  $\mu\text{g/mL}$  against the fungus *Cladosporium shaerospermum*) obtained from Brazil Altitude fields and *Penicillium* cf. *coffea* UFMGCB 100021 (MIC = 125  $\mu\text{g/mL}$  against *C. albicans*) was also possible to identify the fatty acids: palmitic, stearic, oleic and linoleic, in both and pentadecanoic and heptadecanoic only in *Acremonium* sp. UFMGCB 7138. Among the yeasts isolated from rocks of continental Antarctica, which were tested in astrobiology experiments, *Rodothorula mucilaginosa* AN6ADG-1 showed no significant loss of viability, even after exposure to UV-C and environmental UV, as well as in culture media with up to NaCl 2M. From the results obtained in this study, We can conclude that this work contributed to a better understanding of the fungal community present in rocks of ecosystems studied, especially considering the pioneering study with samples from Brazil Altitude fields and the Atacama Desert. Bioprospecting results and chemical study of bioactive extracts demonstrated that community fungi present in rocks from ecosystems sampled can be a source of bioactive substances producing species. Furthermore, within fungal community that live in rocks from extreme ecosystems may also contain fungi eukaryotes models for studies of life out of the planet.

## 1. Relevância e justificativa

Alguns ecossistemas são conhecidos como extremos por possuírem características diferentes daqueles em que a maior parte dos seres vivos é capaz de sobreviver. A vida nesses ecossistemas é comumente dominada por micro-organismos capazes de se desenvolver e reproduzir em condições de altas ou baixas temperaturas, baixa disponibilidade de água e nutrientes, alta incidência de radiação UV, extremos de pH, salinidade e pressão, os quais são denominados extremófilos. Neste contexto, a superfície e o interior das rochas, em muitos casos, são considerados ecossistemas inóspitos devido às condições extremas de temperatura, mudanças rápidas na atividade de água e alta radiação UV presentes.

Nos últimos anos alguns trabalhos foram realizados visando caracterizar a comunidade de fungos endolíticos, associados a rochas de ambientes extremos como desertos, o continente antártico ou até mesmo monumentos expostos a alta incidência de radiação UV e baixa disponibilidade de água e nutrientes. Este grupo de fungos apresenta distribuição mundial e recebe várias denominações tais como fungos melanizados, fungos micro-coloniais (MCF), fungos negros e meristemáticos. Os fungos melanizados são conhecidos por apresentarem um crescimento lento e meristemático, formam pequenas colônias, possuem alta plasticidade morfológica, alta melanização, não são liquenizados e gastam pouca energia nos processos de esporulação e dispersão. No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados para caracterizar a diversidade de fungos tanto a superfície como o interior das rochas.

A produção de melanina, micosporinas e o crescimento meristemático também são algumas das estratégias destes micro-organismos presentes em rochas e que viabilizam sua sobrevivência frente às condições extremas. Diante da sua ampla distribuição e proximidade filogenética entre os fungos associados a rochas e outras espécies conhecidas como produtoras de metabólitos secundários com atividade biológica, este grupo de fungos apresenta potencial em programas de bioprospecção de moléculas bioativas.

Além disso, a possibilidade de vida fora do planeta se tornou tema de grande interesse científico. A partir de estudos com diferentes formas de vida, como bactérias, arqueias, cianobactérias, fungos liquenizados e melanizados isoladas de ecossistemas extremos, alguns trabalhos vêm sendo conduzidos com o intuito de caracterizar organismos modelos capazes de sobreviver a condições extraterrestres. Sabendo-se que fungos presentes em rochas são capazes de tolerar a dessecação, elevada exposição aos raios UV, temperaturas extremas e grandes flutuações térmicas, esses micro-

organismos podem representar potenciais modelos eucarióticos para estudos de astrobiologia, uma vez que as estratégias de adaptação selecionadas podem ser consideradas ferramentas cruciais nos estudos que investigam os limites da vida.

5 A partir do exposto acima, torna-se claro a necessidade de estudos que visem conhecer a riqueza de espécies de fungos presentes em rochas de diferentes ecossistemas extremos do planeta e seu estudo como fonte de moléculas bioativas, bem como sua utilização como modelos eucariotos para estudos de astrobiologia. Dessa forma, este trabalho visa responder as seguintes questões:

- 10 • Qual a riqueza, diversidade e similaridade de fungos presentes em rochas de ecossistemas extremos do Brasil, Antártica e Deserto do Atacama?
- Estas comunidades de fungos, por serem crípticas, adaptadas a condições extremas e por talvez possuírem vias metabólicas ainda não estudadas, podem ser boas fontes de metabólitos bioativos com potencial uso biotecnológico?
- 15 • Dentre essas comunidades é possível selecionar espécies ou isolados capazes de sobreviver a condições extraterrestres e por isso representar bons modelos eucariotos para estudos de astrobiologia?

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Micro-organismos extremófilos

5 A maior parte dos organismos é capaz de sobreviver em ambientes com pH próximo  
ao neutro, temperaturas entre 20° e 30 °C, pressão próxima de 1 atm e disponibilidade  
adequada de água, nutrientes e sais (SATYANARAYANAN *et al.*, 2005). Condições  
ambientais fora dos parâmetros físico-químicos em que a maioria dos organismos é capaz  
de sobreviver caracterizam os ambientes conhecidos como extremos. De acordo com Oarga  
(2009), pesquisas sobre ambientes extremos são importantes para estudos taxonômicos,  
10 ecológicos e evolutivos, pois podem propiciar a descoberta de novas espécies e aumentar o  
entendimento da evolução espécies em nível molecular.

Os organismos extremófilos foram descritos por Kristjánsson & Hreggvidsson (1995)  
como aqueles capazes de sobreviver em ambientes com parâmetros ambientais além do  
considerado “normal” (aqueles em que se encontram temperaturas entre 4° e 40 °C, pH  
15 entre 5 e 8,5 e salinidade entre a da água continental e marinha). Em relação às condições  
extremas, os extremófilos podem ser classificados de acordo com a capacidade de crescer  
em baixas temperaturas (psicrófilos); altas temperaturas: (termófilos); baixo pH (acidófilos);  
elevado pH (alcalófilos); condições extremas de pressão, dessecação e salinidade  
(barófilos, xerófilos e halófilos, respectivamente). Além disso, aqueles encontrados em  
20 ambientes com mais de um parâmetro extremo são chamados de poliextremófilos  
(ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001; MAGAN, 2007).

As comunidades biológicas presentes nos ambientes extremos são constituídas,  
principalmente, por micro-organismos (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003), os quais são  
encontrados em substratos como gelo, águas termais e ácidas, cristais de sal, resíduos  
25 tóxicos e até águas de reatores nucleares (PEARCE, 2009). De acordo com  
Satyanarayanan *et al.* (2005), micro-organismos extremófilos não somente toleram  
condições extremas específicas como também requerem as mesmas para a sobrevivência e  
crescimento. Os micro-organismos extremófilos são capazes de atuar nos ciclos  
biogeoquímicos e são frequentemente, estudados pelos seus papéis ecológicos e potencial  
30 biotecnológico (KOGÉJ *et al.* 2006; DE GARCÍA *et al.*, 2007). Entre os grupos microbianos,  
algumas espécies de fungos são capazes de crescer e se propagar em diferentes ambientes  
extremos do planeta tais como águas hipersalinas (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003),  
superfícies de rochas (STEFLINGER, 1998), sedimentos marinhos (LOPEZ-GARCIA *et al.*,  
2001; GONÇALVES *et al.*, 2013), lagos da Antártica (ELLIS-EVANS, 1996; GONÇALVES *et*

*al.*, 2012), solos oligotróficos do continente antártico (AZMI & SEPPELT, 1997; GODINHO *et al.*, 2015) e solos permanentemente congelados (*permafrost*) (ZUCCONI *et al.*, 2012).

## 2.2 Adaptações evolutivas dos micro-organismos extremófilos

5

Entre os parâmetros físicos mais importantes para a vida, a temperatura é provavelmente o mais estudado (PRIEUR, 2007). A temperatura afeta os organismos de diferentes maneiras, desde a destruição celular pela formação de cristais de gelo no interior da célula, até a desnaturação de biomoléculas (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001; OARGA, 2009). De acordo com Johnson (2010), os organismos termófilos podem ser subdivididos em:

- Termotolerantes - aqueles que crescem em temperaturas superiores a 45 °C, mas com temperatura ótima de crescimento próxima de 40 °C;
- 15 • Termófilos moderados - aqueles que crescem em temperatura ótima de 40° a 60 °C;
- Termófilos extremos - aqueles que crescem em temperatura ótima de 60° a 80 °C;
- Hiper-termófilos - aqueles que crescem em temperatura ótima superior a 80 °C.

De acordo com Maheshwari *et al.* (2000), os fungos termófilos são encontrados em ambientes com temperatura máxima de 61 °C. O principal desafio para os micro-organismos encontrados em ambientes com altas temperaturas é a manutenção da fluidez da membrana plasmática que mantém a integridade da célula e é responsável pela geração de energia em procariotos (JOHNSON 2010). Uma das adaptações encontradas é a composição química de lipídios a base de éter e não éster, que proporciona maior estabilidade da membrana (JOHNSON 2010). De acordo com mesmo autor, em arqueas outra adaptação comumente encontrada em micro-organismos termófilos é o aumento das interações hidrofóbicas dentro das moléculas de proteínas e enzimas extracelulares, proporcionando a manutenção da atividade destas moléculas em altas temperaturas.

Os micro-organismos eucariotos e termófilos possuem um repertório de mecanismos para estabilização de enzimas, com vários mecanismos atuando em diferentes proteínas como, por exemplo, a estabilidade intrínseca por íons, atuação de proteínas celulares, incluindo moléculas de chaperoninas, associações covalentes ou não covalentes entre os constituintes da parede celular (MAHESHWARI *et al.*, 2000). Além disso, no material genético microbiano pode-se encontrar um aumento da concentração dos nucleotídeos G e C, o que confere maior estabilidade a fita dupla de DNA, bem como a proteção por proteínas semelhantes a histonas (SATYANARAYANA *et al.*, 2005).



Os micro-organismos encontrados em ambientes com temperaturas abaixo de 5 °C e que crescem em temperaturas ótimas de 15 °C, e no máximo 20 °C são conhecidos como adaptados ao frio ou psicrófilos. Ainda existem aqueles que crescem melhor em temperaturas entre 30 e 40 °C, mas também são capazes de crescer em baixas temperaturas e são denominados psicrotolerantes (JOHNSON 2010). Em geral uma combinação de estratégias é empregada (ROBINSON, 2001) por estes micro-organismos, sendo uma delas o acúmulo de trealose nas células vegetativas e nos esporos, que juntamente com outros açúcares e glicogênio parece estar relacionado com a estabilização da membrana plasmática durante os períodos de desidratação ocasionados pelas baixas temperaturas (GOODRICH *et al.*, 1988). Outra adaptação comum presente nos micro-organismos psicrófilos é o aumento da concentração de ácidos graxos insaturados na membrana lipídica (VISHNIAC, 2006), o que proporciona o aumento do ponto de fusão e manutenção da fluidez da membrana. Para Robison (2001) é necessário um ambiente aquoso extracelular, explicado pela presença de proteínas anticongelantes que dificultam a formação do gelo no ambiente extracelular, evitando o congelamento de substâncias no interior das hifas e permitindo o crescimento fúngico em temperaturas próximas de 0 °C (CHRISTNER, 2010). Neste mesmo contexto, a produção de enzimas ativas em baixas temperaturas é uma adaptação importante para sobrevivência dos fungos psicrófilos (ADAMS *et al.*, 2006; BRIZZIO *et al.*, 2007; DE GARCÍA *et al.*, 2007, VAZ *et al.*, 2011).

A radiação solar também é um fator físico que pode ser prejudicial aos organismos. A alta exposição à radiação ultravioleta (UV) pode causar danos ao DNA, proteínas celulares, membrana lipoprotéica e das organelas citoplasmáticas (KARENTZ, 1994), o que é capaz de afetar em larga escala a evolução biológica (COCK-ELL & BLAUSTEIN, 2001). De acordo com Selbamann *et al.* (2005), a radiação UV-B causa fortes efeitos mutagênicos no DNA microbiano. Entretanto, os micro-organismos são capazes de apresentar uma série de mecanismos de reparo ou tolerância aos danos causados pelo efeito da radiação UV, como a tradução de proteínas responsáveis por reparar lesões no DNA. Os micro-organismos expostos à alta radiação UV são capazes de produzir diferentes tipos de pigmentos, ou uma combinação deles, localizados extra ou intracelularmente para proteger o metabolismo normal das células (RUISI *et al.*, 2007), tais como carotenóides e/ou micosporinas. Muitas espécies de leveduras acumulam carotenóides nas células, conhecidos como  $\beta$  e  $\gamma$ -carotenos, os quais possuem ação antioxidante (LIBKIND *et al.*, 2005). Já as micosporinas, moléculas de baixo peso molecular, funcionam como protetores solares e também atuam na eliminação de espécies reativas de oxigênio (GOSTINCAR *et al.*, 2011). A melanina, um pigmento de alto peso molecular, também possui um importante papel na proteção contra UV, dessecação e tolerância à radiação (STERFLINGER *et al.*, 2012). Várias espécies de micro-organismos produzem melanina, em especial os fungos (JACOBSON, 2000). De

acordo com Dadachova *et al.* (2007), a proteção contra a radiação ionizante é proporcionada devido a uma combinação de fatores como a composição química, a presença de radicais estáveis e ao arranjo espacial da molécula de melanina.

Outro fator limitante encontrado em diversos ambientes é a escassez de água. Embora os organismos sejam dependentes da presença de água (OARGA, 2009), alguns micro-organismos são capazes de resistir à dessecação por meio da produção de metabólitos extra e intracelulares. De acordo com Ruisi *et al.* (2007), osmorreguladores intracelulares de baixo peso molecular são acumulados em grandes concentrações sem interferir na atividade enzimática e no metabolismo celular. Os fungos são conhecidos pela habilidade de tolerar o estresse osmótico por meio do acúmulo intracelular de solutos, representados principalmente pelo glicerol e arabitol (BREWER, 1999; PASCUAL *et al.*, 2002; RUISI *et al.*, 2007). Mas alguns fungos meristemáticos, como por exemplo, *Phoma herbarum* isolado da Antártica, produzem polissacarídeos extracelulares para se proteger na escassez de água (SELBMANN *et al.*, 2002). Gorbushina *et al.* (2008) concluíram que as respostas durante o processo de dormência dos fungos melanizados são inespecíficas. Estes autores verificaram um aumento da concentração de melaninas antioxidantes na parede celular, estabilização da membrana celular por carotenóides, ativação das moléculas que filtram radiação UV, dos antioxidantes e osmorreguladores por meio da presença intracelular de micosporinas, bem como o aumento na proporção de ácidos graxos e níveis normais de lipídeos na membrana mantendo-a em um estado fisiológico estável.

### **2.3 Ecossistemas extremos: Antártica, Deserto do Atacama e Campos de Altitude do Brasil**

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, formado por extensas montanhas, cordilheiras e desertos (AZMI & SEPPELT, 1997). O continente antártico é caracterizado pelo isolamento geográfico e sua maior parte possui pouca ou nenhuma influência antrópica (BRUNATI *et al.*, 2009). Além disso, a Antártica apresenta um clima frio e seco, com incidência de fortes ventos e alta radiação solar durante a estação de verão (SHIVAJI & PRASAD, 2009). A radiação UV também é um dos fatores de estresse mais importantes, ainda que poucos estudos tenham sido realizados para avaliar as consequências da radiação UV sobre as comunidades de fungos nesse ecossistema (RUISI *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas diferentes estudos com bactérias, protistas, algas e fungos foram conduzidos com substratos obtidos na Antártica (DEL FRATE & CARETTA 1990; VAN

TRAPPEN *et al.*, 2005; BECQUEVORT *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2009, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010; VAZ *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012). Os ecossistemas antárticos representam habitats extremos devido a características como a baixa atividade de água e alta radiação UV, aonde os fungos presentes vêm sendo estudados com maior frequência (KOGÉJ *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2009, 2010; LOQUE *et al.*, 2010; ARENZ & BLANCHETT, 2011; ZUCCONI *et al.*, 2012). Tais condições ambientais encontradas na Antártica resultam em fatores limitantes para o metabolismo e crescimento dos seres vivos (COWAN & TOW, 2004).

Por muito tempo acreditou-se que as regiões de deserto localizadas em diferentes pontos do planeta, como América do Norte, África, Ásia, Austrália, Antártica e América do Sul eram inóspitas para todos os tipos de vida (CARY *et al.*, 2010). Enquanto os solos presentes em desertos apresentam uma quantidade, ainda que pequena, de carbono orgânico, resultante da produção primária de plantas e cianobactérias, além da capacidade de reter por algum tempo a água proveniente de chuvas rápidas, as rochas expostas em desertos quentes ou frios constituem um dos substratos mais estressantes do planeta (STERFLINGER *et al.*, 2012). As superfícies de rochas fornecem condições de vida muito peculiares para os organismos epi- e endolíticos (STERFLINGER, 1998). Devido às condições extremas de temperatura, rápidas mudanças na atividade de água, alta radiação UV (WAINWRIGHT, 1993), fontes insuficientes de nutrientes e água (GORBUSHINA *et al.*, 2008) caracterizam estes habitats como ambientes extremos. Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de caracterizar a comunidade microbiana do fino revestimento de 30 a 100 µm, de cor escura, rico em manganês, encontrado sobre as rochas de ambientes quentes como desertos, bem como ambientes secos como o continente antártico (KUHLMAN *et al.*, 2008; NORTHUP *et al.*, 2010). Enquanto alguns autores propõem que a diversidade de micro-organismos, incluindo os fungos, é baixa quando comparada a diversidade em solos de regiões temperadas e tropicais (STERFLINGER *et al.*, 2012), Grishkan & Nevo (2010) obtiveram 185 espécies de fungos pertencentes a 76 gêneros diferentes isolados a partir de amostras de solo do Deserto de Negev em Israel.

O Deserto do Atacama que se estende pela costa do Pacífico em território chileno é um dos desertos mais seco e possivelmente, antigo do mundo (MCKAY *et al.*, 2003), o qual pode ser considerado um habitat extremo para existência de vida e com condições análogas às encontradas em Marte. Segundo Sterflinger *et al.* (2012), os principais e mais importantes fatores de estresse encontrados nesses ambientes são: (i) disponibilidade limitada de água, (ii) extremos e mudanças drásticas de temperatura, (iii) limitada disponibilidade de carbono orgânico, (iv) intensa radiação UV e (v) estresse osmótico causado pelo aumento da concentração de sal no solo e nas rochas. Apesar das características extremas encontradas no Deserto do Atacama, sabe-se que é possível

encontrar espécies de todos os domínios de seres vivos nesses ambientes (COCKEL *et al.*, 2001).

5 Nas escarpas mais altas e íngremes das serras do sudeste brasileiro encontra-se uma vegetação predominantemente campestre, de características fisionômicas e ecológicas únicas, denominados por Ferri (1980) como Campos de Altitude. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2008), os Campos de Altitude correspondem à vegetação com estrutura herbácea ou herbáceo-arbustiva, caracterizada por comunidades florísticas próprias, que ocorre sob clima tropical, subtropical ou temperado, geralmente nas serras de altitudes elevadas. Encontram-se inseridos na área de abrangência da Mata Atlântica, em altitudes 10 que em geral variam de 500 a 2.000 m (CAIAFA & SILVA, 2005). Aparecem também como elementos da paisagem de altitudes elevadas, de rocha aflorada, penhascos e picos rochosos (SAFFORD & MARTINELLI 2000). Nestes ambientes, quanto maior a altitude, maior é a incidência de radiação UV e menor é a concentração de oxigênio (ISOLA *et al.*, 2010) a que a comunidade microbiana local está exposta. Apesar da importância biológica 15 encontrada nesses ambientes, pelo nosso conhecimento, não existem estudos a respeito da comunidade de fungos presentes em rochas desses ecossistemas brasileiros.

## 2.4 Fungos presentes em rochas

20 A comunidade microbiana associada a rochas é formada por cianobactérias, bactérias quimio-organotróficas e fungos, principalmente os liquenizados (STERFLINGER, 1998). Os fungos, em geral, são facilmente dispersos e capazes de colonizar e se estabelecer em diferentes substratos e condições ambientais (RUISI *et al.*, 2007). Fungos melanizados, que estão comumente presentes em rochas, apresentam um padrão de 25 crescimento restrito *in situ* e *in vitro* em forma de microcolônias e, por isso, são denominados fungos melanizados, negros, dematiáceos, micro-coloniais (MCF) ou *rock-inhabiting fungi* (RIF) (STALEY *et al.*, 1982; STERFLINGER 1998; RUIBAL *et al.*, 2008). Todos esses termos estão relacionados ao fato desses micro-organismos presentes em rochas compartilharem características micro e macro-morfológicas comuns, apesar de 30 possuírem diferentes origens filogenéticas (STERFLINGER *et al.*, 1999). Fungos melanizados apresentam distribuição mundial como colonizadores das superfícies de rochas, crescem lentamente e gastam pouca energia com dispersão e esporulação (GORBUSHINA, 2003; GORBUSHINA *et al.*, 2003). Estes fungos possuem alta melanização, crescimento meristemático e não são liquenizados (GORBUSHINA *et al.*, 35 1993; STERFLINGER & PRILLINGER, 2001; BOGOMOLOVA & MINTER, 2003). Além disso, algumas espécies de fungos melanizados são estudadas por serem consideradas

oportunistas com significativa importância clínica (de HOOG *et al.*, 1994; 1998; 2000). Outras são focos como modelos eucariotos para estudos de astrobiologia (GORBUSHINA, 2003) e de relações ecológicas e evolutivas (UNTEREINER & MALLOCH 1999; CROUS *et al.*, 2000, 2007).

5 Fungos presentes em rochas utilizam algumas estratégias para suportar as condições extremas. Segundo Gorbushina (2003), micopsporinas foram encontradas em alguns isolados de fungos presentes em rochas. Além do papel já conhecido dessas moléculas como protetores solar, os resultados obtidos foram relacionados também com a sobrevivência, crescimento restrito e longevidade desses fungos. O crescimento  
10 meristemático de algumas espécies representa um mecanismo de proteção contra a radiação UV que minimiza a exposição da superfície das colônias à radiação solar. Portanto, a espessura da parede melanizada presente em muitos desses fungos representa uma característica estável e altamente efetiva como estratégia contra a radiação UV. Já os fungos considerados cripto-endolíticos, encontrados no interior das rochas, possuem  
15 proteção contra a radiação UV devido ao habitat em que são isolados (RUISI *et al.*, 2007).

Os micro-organismos capazes de crescer em ambientes extremos, como as rochas, atuam nos ciclos biogeoquímicos e são, frequentemente, estudados pelo papel ecológico e potencial biotecnológico que possuem (KOGÉJ *et al.*, 2006; DE GARCÍA *et al.*, 2007). Diferentes estudos têm dado enfoque à comunidade microbiana presente nas rochas, uma  
20 vez que a presença das condições ambientais extremas nestes ambientes é responsável por selecionar a colonização de fungos tolerantes ao estresse local (STALEY *et al.*, 1982; URZÍ *et al.*, 1993; STERFLINGER & KRUMBEIN 1995; WOLLENZIEN *et al.*, 1995; STERFLINGER & KRUMBEIN 1997; STERFLINGER 2000; STERFLINGER & PRILLINGER 2001; BOGOMOLOVA & MINTER 2003; DE LEO *et al.*, 2003; RUIBAL *et al.*, 2008).  
25 Entretanto, ainda é escasso trabalhos sobre a diversidade de fungos presentes em rochas de ecossistemas tropicais, temperados e polares. Segundo Gorbushina (2007), os fungos de rochas podem ser divididos em dois grupos ecológica e taxonomicamente distintos:

- Hifomicetos isolados de solo e fungos de origem epifítica (DE LEO *et al.*, 1996);
- Fungos micro-coloniais melanizados que formam micro-colônias compactas (STALEY *et al.*, 1982; GORBUSHINA *et al.*, 1993), pertencentes à classe *Ascomycetes* (ordens *Chaetothyriales*, *Dothideales* e *Capnodiales*).

Os fungos dimórficos meristemáticos e melanizados são comumente encontrados em  
35 ambientes considerados extremos. Dessa forma, esses micro-organismos são considerados eucariotos extremófilos atrativos para estudos de adaptação a condições adversas (KOGÉJ *et al.*, 2006). De acordo com Gorbushina (2003), as rochas são alvos interessantes para a

pesquisa sobre as características relacionadas à sobrevivência em ambientes hostis. Estes ambientes peculiares provavelmente estão distribuídos por todo o Universo e os fungos presentes podem ser capazes de sobreviver e crescer diante das condições extremas encontradas (GORBUSHINA *et al.*, 2003).

5 Diante da potencial diversidade de fungos presentes em rochas de ambientes extremos, torna-se claro a importância de estudos que possibilitem conhecer sua diversidade em rochas de ambientes ainda não explorados, bem como comparar os resultados obtidos com aqueles oriundos de ambientes já estudados até o momento.

## 10 **2.5 Metabólitos bioativos de fungos extremófilos**

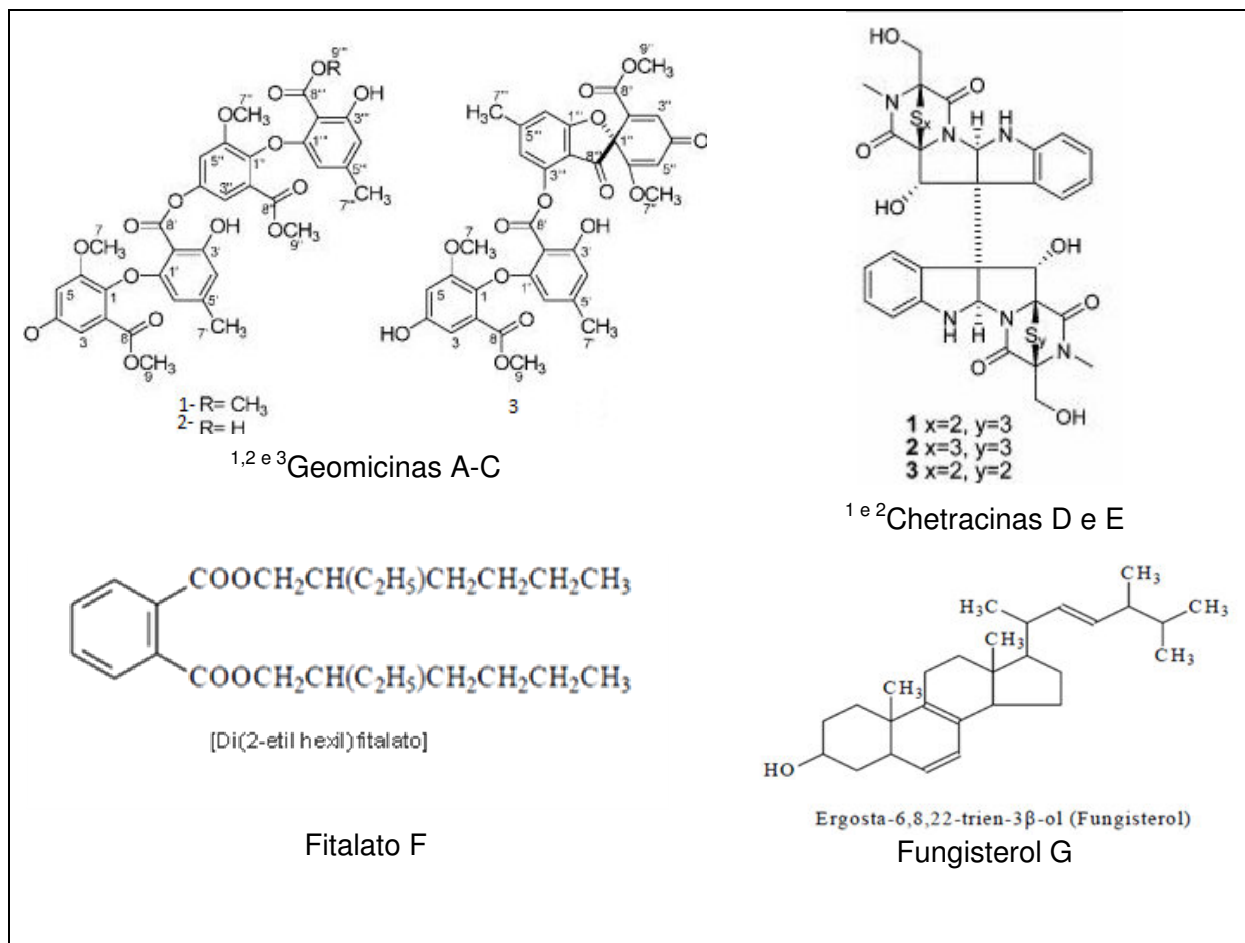
Os metabólitos secundários (ou produtos naturais) são substâncias de baixo peso molecular (DEMAIN, 1981) e extremamente variáveis quanto à estrutura, incluindo antibióticos, toxinas, alcalóides, terpenóides e poliacetilenos (BÉRDY, 2005). São vistos  
15 como moléculas bioativas que atuam como bons protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (CHIN *et al.*, 2006).

Segundo Rothschild & Mancinelli (2001), além dos organismos extremófilos fornecerem dados fundamentais para o conhecimento da biologia molecular e evolutiva, esses organismos possuem um grande potencial econômico, pois podem ser fonte de  
20 metabólitos de interesse na indústria agrícola, química e farmacêutica. Neste contexto, os metabólitos secundários são elementos de grande importância quanto à diversidade molecular e funcionalidade biológica, características indispensáveis para o descobrimento de fármacos e pesticidas úteis para a humanidade. De acordo com Saleem *et al.* (2009), entre os anos de 2000 e 2008, mais de 300 metabólitos secundários foram relatados com  
25 diferentes efeitos antimicrobianos.

Nos últimos anos tem crescido o interesse na diversidade e biotecnologia de fungos extremófilos (ATALA *et al.*, 2011; KOCHKINA *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012; SCHMIDT *et al.*,  
30 2012; WU *et al.*, 2012, GODINHO *et al.*, 2013), os quais são conhecidos por produzir metabólitos com potencial biotecnológico (Figura 1). Apesar dos fungos extremófilos serem considerados uma potencial fonte de metabólitos e encontrados em relativa diversidade na natureza, poucos desses micro-organismos foram, até o momento, selecionados como fonte de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Para que os organismos se desenvolvam em condições extremas de pH, temperatura, radiação UV, salinidade e pressão, adaptações únicas como a biossíntese de novas moléculas, que vão desde  
35 simples lipídios a complexos metabólitos secundários, estão presentes nestes micro-

organismos (WILSON & BRIMBLE 2009). Os fungos adaptados às condições extremas são investigados pela capacidade de produção de fotoprotetores (micosporinas e pigmentos), antioxidantes e enzimas ativas em extremos de temperaturas (RAY *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 2000; LIBKIND *et al.*, 2005; DE GARCÍA *et al.*, 2007; CARRASCO *et al.*, 2001; VAZ *et al.*, 2011). Dessa forma, estes fungos merecem atenção não só pela importância na ciclagem de nutrientes e produção de biomassa nos ecossistemas extremos, mas também pelo potencial biotecnológico (DEMING, 2002; FOGHT *et al.*, 2004; RASPOR & ZUPAN, 2006; FURBINO *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2015), uma vez que seus metabólitos secundários podem ser utilizados como moléculas protótipos para o desenvolvimento de fármacos e pesticidas.

Os fungos presentes em rochas apresentam características que os tornam um grupo interessante em programas de bioprospecção de metabólitos bioativos (RUIBAL *et al.*, 2008). Estes micro-organismos são encontrados em rochas de diferentes ecossistemas; podem ser cultivados; além de algumas espécies serem relacionadas com outros *Ascomycota* conhecidos por possuírem várias vias de produção de metabólitos secundários (KROKEN *et al.*, 2003). Todas essas características os tornam promissores na busca de metabólitos bioativos.



**Figura 1:** Estruturas químicas de moléculas isoladas de fungos extremófilos. <sup>1, 2 e 3</sup>Geomicinas (A-C) isoladas de culturas de *Geomyces* sp., com atividades antifúngica e antimicrobiana (LI *et al.*, 2008). <sup>1 e 2</sup>Chetracinas (D e E) ativas contra linhagens de células tumorais humanas isoladas do fungo psicrófilo *Oidiodendron trucatum* (LI *et al.*, 2012). Metabólitos antibacterianos e citotóxicos (F e G) isolados do fungo *Penicillium brevicompactum* obtido do talo da alga marinha *Pterocladia* sp. (ATALLA *et al.*, 2011).

## 2.6 Fungos extremófilos: modelos para estudos de astrobiologia

- 5 Nas últimas décadas a possibilidade de existência de vida em outros planetas se tornou tema de grande interesse para ciência (GORBUSHINA *et al.*, 2003; GRAHAN, 2004; STORRIE-LOMBARDI & SATTLER 2009; VERA *et al.*, 2010) devido, principalmente, ao desenvolvimento tecnológico e ao rápido aumento do conhecimento sobre a natureza do sistema solar e das galáxias. De acordo com a hipótese da panspermia, formas de vida
- 10 simples podem ter colidido com o planeta Terra após um longo período de permanência no espaço e desenvolvido, ao longo da evolução, as formas de vida conhecidas atualmente



(LIMA 2010). No entanto, atualmente a litopanspermia é a versão mais aceita da hipótese de panspermia. De acordo com a litopanspermia a viabilidade de transferência de material vivo para fora do planeta envolve a sua ejeção do planeta de origem, resistência às condições do espaço e a chegada não destrutiva do material biológico no planeta de destino (ONOFRI *et al.*, 2008).

A princípio, a presença de esporos e estruturas diferenciadas microbianas era associada apenas à sobrevivência em ecossistemas extremos (GORBUSHINA *et al.*, 2002). Entretanto, a partir de estudos com diferentes formas de vida, como bactérias, arqueias, cianobactérias, fungos liquenizados e melanizados obtidos de ecossistemas extremos, alguns trabalhos foram conduzidos com o intuito de buscar modelos capazes de sobreviver às condições extraterrestres (GORBUSHINA, 2003; GILICHINSKY *et al.*, 2007; HORNECK *et al.*, 2008; FENDRIHAN *et al.*, 2009; VERA *et al.*, 2010; BILLI *et al.*, 2011; WOLFE-SIMON *et al.*, 2011). A princípio, os estudos de astrobiologia foram realizados com organismos procariotos, no entanto, o fato dos fungos presentes em rochas serem capazes de tolerar a dessecação, elevada exposição aos raios UV, temperaturas extremas e grandes flutuações térmicas, fez com que esses micro-organismos fossem considerados potenciais modelos eucarióticos para estudos de astrobiologia (ONOFRI *et al.*, 2004).

De acordo com Gorbushina *et al.* (2002), as comunidades biológicas presentes em rochas possuem a habilidade de sobreviver às mudanças extremas das condições da superfície do planeta, de manter a viabilidade por até 100 anos na ausência de água líquida, fontes de energia e nutrientes; de induzir dano celular ou morte e de sobreviver a altas doses de energia solar e radiação cósmica diretamente na superfície. Neste contexto, os fungos melanizados associados a rochas representam eucariotos únicos que podem ser utilizados como objeto de estudos na astrobiologia (GORBUSHINA, 2003), uma vez que estão presentes em ecossistemas expostos a alta radiação UV, temperaturas extremas, pouca disponibilidade de água e nutrientes. As vias metabólicas dos fungos melanizados, as alterações geomorfológicas produzidas por eles nos locais onde são encontrados e associação com diferentes biominerais os tornam alvos promissores para a detecção de evidências de vida fora do planeta (GORBUSHINA *et al.*, 2001).

Segundo Horneck (1999), parâmetros extraterrestres tais como vácuo, intensa radiação solar, diferentes componentes da radiação cósmica e extremos de temperatura afetam a estabilidade genética dos organismos no espaço, levando a um aumento das taxas de mutação, danos ao DNA, além da inativação celular. Neste contexto, os estudos que avaliam as respostas de organismos extremófilos frente aos limites de condições de vida têm aumentado nos últimos anos (ONOFRI *et al.*, 2008). Onofre *et al.* (2008) avaliaram a resistência dos fungos *Cryomyces antarcticuse Cryomyces minteri* (isolados de rocha do continente antártico) e da comunidade criptoendolítica presente em fragmentos de rochas a

condições existentes no espaço e no planeta Marte. Os resultados demonstraram uma boa resistência dos isolados estudados, de forma que isolados de *C. minteri* e *C. antarcticus* foram selecionados como candidatos adequados para resistir aos voos espaciais e permanecer no espaço por muito tempo. Considerando que o tempo mínimo estimado para que meteoritos de Marte cheguem a Terra seria de um ano e a eventual sobrevivência dos fungos e da comunidade endolítica após um ano e meio de permanência no espaço (condições simuladas nos experimentos), estes resultados representam uma contribuição nos estudos sobre a transferência de vida interplanetária.

A partir do exposto acima, tornam-se importantes estudos que visem conhecer a riqueza de espécies de fungos presentes em rochas de diferentes ecossistemas extremos da Terra. Estes ambientes podem representar uma fonte promissora de fungos extremófilos modelos eucariotos de estudo sobre os limites da vida e suas aplicações em trabalhos de astrobiologia.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

5           Caracterizar a comunidade de fungos cultiváveis presentes em rochas de ecossistemas extremos, avaliar sua capacidade em produzir metabólitos bioativos e resistir a condições extraterrestres.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 10       • Isolar fungos presentes em rochas do Campo de Altitude do Brasil; Deserto do Atacama no Chile e região continental da Antártica,
- Contribuir para montagem de uma coleção temática de fungos de ambientes extremos, depositando todos os fungos obtidos na coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais;
- 15       • Identificar os fungos obtidos por meio de técnicas moleculares;
- Determinar a diversidade, riqueza, dominância e similaridade das comunidades dos fungos encontrados;
- Cultivar e preparar extratos a partir das culturas dos fungos obtidos para montagem de uma coleção de extratos de fungos extremófilos;
- 20       • Caracterizar a capacidade dos fungos obtidos em produzir metabólitos com atividade antimicrobiana, citotóxica, leishmanicida, tripanosomicida e antiviral;
- Caracterizar e isolar por meio do fracionamento químico biomonitorado os metabólitos bioativos produzidos pelos fungos ativos;
- Submeter os fungos obtidos a condições extraterrestres de radiação UV.

25

### **4. Metodologia**

#### **4.1 Áreas de amostragem**

##### **4.1.1 Campo de Altitude na região da Serra do Caraça, MG, Brasil**

30           A Serra do Caraça está localizada ao sul da Cadeia do Espinhaço, no extremo leste do Quadrilátero Ferrífero, nos Municípios de Catas Altas, Santa Bárbara e Mariana, tendo como área principal de preservação a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Santuário do Caraça. O clima da região caracteriza-se por verões amenos e chuvosos e

com precipitação média anual acima de 1500 mm (BRANDÃO *et al.*, 1994). Segundo Dutra *et al.* (2002), nessa serra predominam temperaturas de 18° a 19 °C, com a máxima raramente ultrapassando os 30 °C e a mínima podendo alcançar valores negativos, principalmente nas maiores altitudes.

5           A Serra do Caraça possui altitudes que variam de 750 a 2.085 metros sobre o mar (m.s.m.), a qual está incluída no bioma Mata Atlântica e possui, predominantemente, formações campestres rodeadas e encravadas por formações florestais típicas da Mata Atlântica. Dentre as formações campestres, Mota (2006) descreve os quatro tipos principais de fitofisionomias presentes no local: campo de altitude, campo limpo; campo sujo e campo  
10           rupestre. As amostras de rocha foram coletadas nos campos de altitude. A amostragem no Santuário do Caraça foi realizada no período de inverno, no dia 21 de Junho de 2011, no Pico do Sol (20°06.692 S; 43°26.658 WO), cuja altitude máxima é 2.085 m.

#### 4.1.2 Deserto do Atacama, Chile

15           O Deserto do Atacama possui aproximadamente 1.000 km que se estende das coordenadas 30° a 20°S, ao longo da costa do Pacífico na América do Sul, na região norte do Chile (MCKAY *et al.*, 2003) e é considerado o deserto mais alto e árido do mundo. As temperaturas no deserto do Atacama variam entre 0° (à noite) e 40 °C durante o dia com  
20           intensa radiação solar. Apresenta terreno rochoso com altitudes que podem chegar a 6.893 m. Possui pouca vegetação, com predominância de plantas de pequeno porte e “liquens”. A amostragem no deserto do Atacama foi realizada em Janeiro de 2012, em oito pontos distintos cujas altitudes variaram de 746 a 5.047 metros.

#### 25   4.1.3 Antártica continental

          As amostras de rochas da Antártica foram obtidas na região das montanhas Ellsworth, localizadas no interior do continente antártico, no manto de gelo da Antártica Ocidental (VIEIRA & SIMÕES, 2011). O manto de gelo possui sua base no fundo do mar e o  
30           seu centro está sobre o embasamento rochoso abaixo do nível do mar. O volume do manto de gelo da Antártica Ocidental passa por flutuações desde o Quaternário, variando de eventos de expansão, com a cobertura de montanhas e vales locais pelo gelo a eventos de retração com a exposição da topografia subglacial. As montanhas Ellsworth localizam-se  
35           próximas a atual zona de *groundingline*, sobre a qual o gelo da plataforma continental começa a flutuar, desprendendo-se do embasamento rochoso. A região é marcada por fortes ventos (CARRASCO *et al.*, 2001) e temperaturas médias anuais em torno de -28 °C,

podendo chegar a -15 °C durante o verão (VIEIRA *et al.*, 2012). A amostragem nas montanhas Ellsworth foi realizada em janeiro de 2013, em nove pontos distintos, cujas altitudes variaram 746 a 973 m.

## 5 4.2 Coletas de amostras de rochas

As rochas foram amostradas de acordo com protocolo sugerido por Ruibal *et al.* (2008), com modificações, a partir de fragmentos sem a presença aparente de fungos liquenizados e com o auxílio de uma talhadeira e marreta. Os fragmentos foram amostrados em diferentes orientações e acondicionados em embalagens previamente esterilizadas (Real Pack, Labplas, Canadá). No Campo de Altitude, na região da Serra do Caraça no Brasil, foram amostrados 15 fragmentos de rochas (separadas a uma distância aproximada de 100-200 m). No Deserto do Atacama, Chile, oito pontos de altitudes distintas foram amostrados e em cada ponto em triplicata. No continente antártico a amostragem foi realizada em nove pontos de altitudes distintas e em triplicata. As amostras do Campo de Altitude no Brasil e do Deserto do Atacama foram transportadas em temperatura ambiente. As amostras do continente antártico foram transportadas congeladas (-20 °C) até o Laboratório e processadas em até uma semana após a coleta.

## 20 4.3 Isolamento e preservação de fungos presentes em rochas

Para o isolamento de fungos a partir dos fragmentos de rocha foram preparadas três subamostras de 1 g e colocadas em três tubos cônicos de 1,5 mL. Os tubos foram colocados no disruptor de células Bullet Blender™ 24 (Uniscience, EUA) e o material pulverizado foi transferido para tubos cônicos de 15 mL contendo 9 mL de solução salina (0,85%). Após homogeneização, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em quatro meios de cultura diferentes:

1. ágar Base Dicloran com Rosa de Bengala (DRBC) (Oxoid). Meio seletivo para isolamento de leveduras e fungos filamentosos, pois contém dicloram e rosa de bengala para inibir os fungos de crescimento rápido, como espécies de *Zygomycota*, e cloranfenicol responsável pela inibição do crescimento bacteriano;
2. ágar base Dicloran-Glicerol (DG18) (Oxoid). Meio seletivo para isolamento de fungos xerofílicos, isolados de substratos com baixa atividade de água, pois contém glicerol,

dicloran e sulfato de estreptomicina e terramicina (50 µg/mL) para inibir o crescimento bacteriano;

3. ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM - peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0%, extrato de malte 0,3% e ágar 2,0%) acrescido de 200 mg/L de cloranfenicol para inibição de bactérias;
4. ágar MYEA (extrato de malte 2,0%, extrato de levedura 0,2% e ágar 2,0%) acrescido de 200 mg/L de cloranfenicol para inibição de bactérias.

As placas foram incubadas por até dois meses, sendo aquelas provenientes das coletas do Campo de Altitude na Serra do Caraça e do Deserto do Atacama a 25 °C, enquanto que as placas provenientes da coleta no continente antártico a 15 °C. Os fungos obtidos foram purificados em placas de Petri contendo o meio YM e incubados sob a mesma temperatura de isolamento dos seus respectivos habitats.

Os fungos filamentosos foram armazenados em duplicata, em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967) e em glicerol 15% a -80 °C. As culturas puras de leveduras foram inoculadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e de fosfato de sódio 0,2%) e após o período de 24-48 horas foi acrescido de 15% glicerol e mantidas a -80 °C. Todos os isolados obtidos foram armazenados na Coleção de Micro-organismos e Células do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

#### 4.4 Identificação dos fungos

As culturas dos isolados de fungos filamentosos obtidas foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso), aspecto da borda, produção de pigmentos e velocidade de crescimento. As leveduras foram agrupadas de acordo com as características macromorfológicas das colônias (cor, tamanho, borda, forma, aspecto e textura).

As leveduras e fungos filamentosos foram submetidos à análise molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se o iniciador (GTG)<sub>5</sub>, de acordo com Lieckfeldt *et al.* (1993). Com base no perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR com o iniciador (GTG)<sub>5</sub>, um isolado dentre os que apresentaram um mesmo padrão de bandas foi selecionado para sequenciamento. No caso das leveduras, o sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal foram utilizados os iniciadores NL1 e NL4. No caso dos fungos filamentosos, o sequenciamento da região

transcrita interna ITS1-5.8S da região gênica do rRNA, foram utilizados os iniciadores ITS1 e ITS4. Além disso, para alguns táxons de filamentosos, também foram submetidos ao sequenciamento dos fragmentos gênicos da  $\beta$ -butulina e RNA polimerase II (RPB2).

## 5 4.4.1 Extração do DNA total

### 4.4.1.1 Leveduras

Para extração do DNA total, os isolados de levedura foram crescidos em agar YM. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em tubos de 1,5 mL com 100  $\mu$ L de tampão de lise (Tris-HCL – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCL 0,1M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e incubadas em banho seco a 65 °C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 100  $\mu$ L de fenol:clorofórmio:isoamílico (25:24:1 – Sigma) aos tubos e os mesmos foram vedados com filme de parafina, homogeneizados em vórtex durante 4 minutos e centrifugados a 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo tudo de 1,5 mL, adicionados 100  $\mu$ L de etanol 70% (Merck) a 4 °C. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos em temperatura ambiente até a evaporação do etanol. O DNA total foi ressuspensado em 50  $\mu$ L de Tris-EDTA (Tris-HCL 0,01M e EDTA 0,001M) e armazenado em freezer a -20 °C.

20

### 4.4.1.2 Fungos filamentosos

A extração do DNA total foi feita de acordo com Rosa *et al.* (2009), com modificações. Os fungos filamentosos foram inoculados em caldo extrato de malte 2% por sete dias. Após esse período, o micélio foi transferido para tubos de 1,5 mL e acrescido de 400  $\mu$ L 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 armazenados a -20 °C. Para a extração do DNA, o micélio foi triturado em extrator de células Bullet Blender<sup>TM</sup> 24 (Uniscience, EUA) com o auxílio de três esferas de aço inox (3,175 mm de diâmetro). Após essa etapa, foram adicionados 162  $\mu$ L de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 30 min a 65 °C. A seguir, foram acrescentados 570  $\mu$ L da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em

30

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 foram acrescentados 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 (Merck) e mantido à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada uma centrifugação a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 µL de etanol (Merck) 70% p/v 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 200 µL 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. O produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thechnologies, EUA) e armazenado a -20 °C até utilização.

#### 4.4.2 Obtenção de amplicons

##### 4.4.2.1 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>

Para confirmação da identificação morfológica, os isolados foram submetidos à análise molecular por meio de PCR microsatélite utilizando o (GTG)<sub>5</sub>. A reação de PCR microsatélite teve um volume final de 25 µL, 2 µL do iniciador (GTG)<sub>5</sub> 10 µmol (Invitrogen), 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 1.25U (Fermentas), 1 a 5 µL do DNA (de modo que a reação final contenha entre 50 e 500 ng) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 93 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 6 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0), resolvidas durante aproximadamente 90 minutos a 80V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).



#### 4.4.2.2 Amplificação utilizando iniciadores NL-1 e NL-4

Das leveduras que apresentarem perfis moleculares distintos um isolado foi selecionado para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA, utilizando os iniciadores NL-1 e NL-4, segundo Lachance *et al.* (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Fermentas), 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada iniciador NL-1 e NL-4 a 10 pmol (Invitrogen), 1 a 5 µL do DNA (de modo que a reação final contenha entre 50 e 500 ng), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 1.25 U (Fermentas) e água ultrapura esterilizada q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 25 segundos de anelamento do iniciador a 54 °C e 20 segundos de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, resolvidas durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

#### 4.4.2.3 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4

Para amplificação da região transcrita interna ITS1-5.8S da região do gene rRNA foram utilizados os iniciadores ITS1 e ITS4, conforme descrito por White *et al.* (1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Fermentas), 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 a 10 pmol (Invitrogen), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 1,25U (Fermentas), 1 a 5 µL do DNA (de modo que a reação contenha entre 50 a 500 ng) e 50 µL q.s.p. água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °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 amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, resolvidas durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

#### 4.4.2.4 Amplificação do fragmento gênico da $\beta$ -tubulina

Para amplificação do fragmento gênico da  $\beta$ -tubulina foram utilizados os iniciadores  
5 BT2a e BT2b, conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada em um  
volume final de 50  $\mu$ L contendo de 1,0 a 5,0  $\mu$ L de DNA (de modo que a reação contenha  
entre 50-500 ng/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador BT2a e BT2b 10  $\mu$ mol (Invitrogen), 5,0  $\mu$ L de  
tampão de PCR 10X (Fermentas), 3,0  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25 mM, 2,0  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu$ L  
10 de *Taq* DNA polimerase 1.25U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura  
esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador  
MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94  
 $^{\circ}C$  por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94  $^{\circ}C$ , 1 minuto  
de anelamento a 59  $^{\circ}C$  e 90 segundos de extensão a 72  $^{\circ}C$  e uma extensão final por 7  
15 minutos a 72  $^{\circ}C$ . Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%  
(Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, resolvidas durante aproximadamente 30 minutos a 120  
V. As amostras foram coradas pela adição GelRed<sup>TM</sup> (Biotium), visualizadas sob luz  
ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat,  
França).

#### 20 4.4.2.5 Amplificação fragmento gênico da RNA polimerase II

Para amplificação parcial da RNA polimerase II (RPB2) foram utilizados os  
iniciadores RPB2 5F e RPB2 7R conforme descrito por Malkus *et al.* (2006). A PCR foi  
realizada em um volume final de 50  $\mu$ L contendo de 1,0 a 5,0  $\mu$ L de DNA (de modo que a  
25 reação contenha entre 50-500 ng/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador RPB2 5F e RPB2 7R a 10  
 $\mu$ mol (Invitrogen), 5,0  $\mu$ L de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3,0  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25 mM, 2,0  
 $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase 1.25U (Fermentas) e o volume final  
completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando  
o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O programa consistiu de uma  
30 desnaturação inicial a 94  $^{\circ}C$  por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 20 segundos de  
desnaturação a 94  $^{\circ}C$ , 55 segundos de anelamento a 55  $^{\circ}C$  e 1 minuto de extensão a 72  $^{\circ}C$   
e uma extensão final por 10 minutos a 72  $^{\circ}C$ . Os amplicons foram analisados por eletroforese  
em gel de agarose 1,0% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, resolvidas durante

aproximadamente 30 minutos a 120V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (VilberLourmat, França).

#### 5 4.4.3 Purificação dos produtos de PCR

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando Etanol-EDTA. Ao produto de PCR (47 µL) foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol e deixados a temperatura ambiente por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.200 rpm por 25 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. A seguir, foram adicionados 120 µL de etanol 70-80% a 4 °C, o tubo centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o etanol descartado por inversão. O tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foram adicionados 10 µL de água e o conteúdo do tubo 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, EUA) e armazenado a -20 °C até o momento da reação de sequenciamento.

#### 4.4.4 Reação de sequenciamento e precipitação das amostras

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 µL, em que foram colocados: 1 µL do iniciador a (5 pmol), 1 µL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 µL de Big Dye, 1 a 5 µL de DNA (de modo que a reação final contenha entre 5 e 20 ng) e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e 4 minutos de extensão final a 60 °C.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de amônio e 50 µL de etanol 96% (Merck), em cada poço. A placa foi homogeneizada com auxílio de um vortex brevemente e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação,

as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 r.p.m à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 r.p.m à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foi acrescentado 10 µL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA).

#### 4.4.5 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos depositadas no GenBank e pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* – versão 2.2.15 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 sequências de ITS, NL, Bt e RPB com valor de E = 0, cobertura e identidade ≥99%, bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente utilizando o programa MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA *et al.*, 2013) foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com valor de E diferente de 0 e cobertura, e identidade ≤98%, os mesmos foram identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Além disso, para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparável a) foi utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência.

Para identificação molecular foram utilizadas as sequências ≥350 pares de bases. As árvores filogenéticas foram construídas 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 6. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Index Fungorum (<http://www.Índexfungorum.org/>) e Kirk *et al.* (2008).

#### 4.4.6 Diversidade da comunidade de fungos: cálculo dos índices de abundância, riqueza, equitabilidade, similaridade e construção de curvas de rarefação

Para avaliar a diversidade de espécies foram utilizados os seguintes índices: (a) Fisher- $\alpha$  (diversidade), (b) Margalef (riqueza) e (c) Simpson (dominância). O índice de

diversidade de Fisher- $\alpha$  é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória onde, comumente algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena (FISHER *et al.*, 1943). Este índice é calculado pela fórmula  $S = a \cdot \ln(1+n/a)$  onde, **S** é o número de táxons presente na amostra, **n** é o número de indivíduos e **a** representa o índice de Fisher- $\alpha$ .

O Índice de Margalef é uma medida utilizada em ecologia para estimar a riqueza de espécies de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Sua fórmula é dada por  $S = (n-1)/\ln(N)$ , onde **n** é o número de táxons encontrados e **N** representa o número de indivíduos. Quanto mais alto o valor de S maior a riqueza de espécies do local amostrado.

O índice de Simpson é muitas vezes utilizado para quantificar a biodiversidade de um ecossistema. Ele leva em conta o número de espécies presentes no local, bem como a abundância de cada espécie. Trata-se de um índice de dominância que mede a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencer à mesma espécie.

O cálculo da Dominância de Simpson (1-D) é dado pela fórmula  $D = \sum(n / N)^2$ , onde **n** é o número total de organismos de uma mesma espécie e **N** o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de  $1 - D$  pode variar de 0 a 1, sendo que 0 representa o mínimo de diversidade e 1 o máximo de diversidade, com as espécies distribuídas igualmente. Sendo assim, uma comunidade de espécies com maior diversidade terá uma menor dominância.

Para avaliar a similaridade entre as comunidades fúngicas dos locais amostrados, 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.

Uma curva de rarefação foi traçada utilizando o índice de Mao Tau, o qual interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas, e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança. Para a construção dessas curvas foi utilizada a densidade de cada táxon obtido. Este cálculo permite uma comparação estatística direta entre a riqueza e os conjuntos de dados (COLWELL *et al.*, 2004). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (RYAN *et al.*,

1995). Todos os índices foram calculados utilizando o programa PAST 1.90 (HAMMER *et al.*, 2001).

## 4.5 Cultivo dos fungos para obtenção dos extratos brutos

### 5 4.5.1 Extratos etanólicos

A princípio, os isolados obtidos das rochas do Campo de Altitude da Serra do Caraça foram cultivados e extraídos com etanol P.A. (Vetec). Discos de aproximadamente 5 mm de crescimento fúngico dos isolados de fungos filamentosos foram inoculados em duas placas de Petri contendo meio de cultura YM. As placas foram incubadas a 25° ou 15 °C, de acordo com a temperatura de isolamento dos fungos, com umidade de 70-80% durante 15 dias. Após crescimento, o meio de cultura e a biomassa fúngica foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL contendo etanol para extração dos metabólitos. Os tubos foram incubados a 10 °C e após 72 horas, o sobrenadante foi transferido para frascos de cintilação e seco em centrífuga a vácuo Savant RVT 400 (Thermo Scientific, EUA) com temperatura inferior a 35 °C. Os extratos secos foram solubilizados em dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma) a uma concentração de 100 mg/mL.

Para o cultivo das leveduras, estas foram inoculadas em tubos contendo caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%) e incubadas a 25° ou 15 °C, de acordo com a temperatura de isolamento, até o crescimento. Após o crescimento, 20 µL do caldo GYMP com as leveduras foram inoculados em microplacas de 24 poços contendo 2 mL por poço de meio YM. 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 etanol P.A., para extração dos metabólitos secundários. As placas de 24 poços foram então incubadas a 10 °C e após 72 horas, o sobrenadante foi filtrado e transferido para frascos de 1,5 mL e secos em centrífuga a vácuo Savant RVT 400 (ThermoScientific, EUA), com temperatura inferior a 35 °C. Os extratos secos obtidos de leveduras e fungos filamentosos foram solubilizados em sulfóxido de dimetila (DMSO) (Sigma) a uma concentração de 100 mg/mL.

30

### 4.5.2 Extratos diclorometânicos

Os extratos etanólicos dos fungos isolados de rochas do Campo de Altitude que apresentaram atividade ≥70% de inibição nos ensaios antimicrobianos foram re-cultivados em meio YM para a obtenção de extratos brutos utilizando o solvente diclorometano (Vetec).

35

Da mesma forma, todos os fungos isolados de rochas do Deserto do Atacama e do continente antártico também foram cultivados para a produção de extratos brutos diclorometânicos. Os isolados foram inoculados em 5 placas de Petri de 90 mm contendo 20 mL de meio YM, incubados a 25° ou 15 °C, de acordo com a temperatura de isolamento dos fungos, com umidade de 70-80% durante 15 dias. Após este período, o meio de cultura e a biomassa fúngica foram transferidos para frascos de vidro e congelados a -80 °C. Após o congelamento das amostras, as mesmas foram submetidas ao processo de liofilização em Liofilizador LioTop-L101 (LioTop, Brasil). Após a completa desidratação da biomassa, foi acrescentado 50 mL de diclorometano P.A. (Vetec). Os frascos foram incubados a temperatura ambiente por 72 horas e o sobrenadante (fase diclorometânica) foi filtrado para frascos de cintilação e seco em centrífuga a vácuo (Savant RVT 400) com temperatura inferior a 35 °C. Como a extração com o solvente diclorometano reduz a quantidade de açúcares e metabólitos mais polares do extrato bruto, a concentração inibitória mínima dos extratos ativos pode ser reduzida. Dessa forma, os extratos foram solubilizados em sulfóxido de dimetila (DMSO) (Sigma) a uma concentração de 100 mg/mL e armazenados a -20 °C até a realização dos ensaios biológicos. Os extratos foram solubilizados em DMSO a uma concentração de 20 mg/mL e armazenados a -20 °C na extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou (LQPN-CPqRR-FIOCRUZ) até a realização dos ensaios biológicos.

20

#### **4.5.3 Cultivo em larga escala**

Após a triagem realizada com os extratos produzidos, o extrato do fungo que apresentou atividade biológica foi re-cultivado em larga escala para obtenção de novo extrato bruto diclorometânico. O fungo selecionado foi cultivado em 500 placas de Petri contendo meio YM e incubado a 25±2 °C com umidade de 70-80%. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi congelado a -80 °C por 48 horas, liofilizado por três dias para remoção da água, sendo posteriormente transferidos para frascos de vidro e adicionados DCM. O conteúdo dos frascos foi mantido a temperatura ambiente durante 2 a 5 dias. Após este período, a fase orgânica foi filtrada através de papel filtro, concentrada com auxílio de rota evaporador (IKA RV10, Alemanha) e então seca. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C para análises posteriores.

30

## 4.6 Ensaios Biológicos

### 4.6.1 Triagem da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi avaliada pelo método de microdiluição em placa de acordo com metodologia descrita nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M7 – A6, vol. 23 n° 2) para as bactérias, com modificações; 7.1 *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFTS-EUCAST, 2002), para leveduras, com modificações; e para fungos filamentosos o “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos” (CLSI M38 – A2, vol.22, n°16), com modificações.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos (ICB/UFMG), utilizando-se como micro-organismos alvo as linhagens de *Escherichia coli* ATCC11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Candida albicans* ATCC60193, *C. krusei* ATCC6258 e *Cladosporium sphaerospermum* CCT1740 (CARVALHO *et al.*, 2012).

#### 4.6.1.1 Ensaio antimicrobiano contra bactérias e leveduras

As bactérias testadas foram crescidas em Agar Mueller-Hinton (Difco) a 35 °C por 24 horas. Após este período, uma alçada da cultura foi suspensa em solução salina estéril 0,85% (0,145 mol/L). A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 0,08 a 0,1 de absorbância a 625 nm, o que corresponde a 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em caldo Mueller-Hinton para utilização no ensaio.

Os isolados das leveduras foram crescidos em ágar Sabouraud (Difco) a 35 °C, por 24 horas. Cinco colônias distintas com diâmetro de aproximadamente 1 mm foram suspensas em solução salina estéril 0,85% (0,145 mol/L). A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 70% de transmitância, a 530 nm, o que corresponde a 10<sup>6</sup> UFC/mL. A padronização foi feita acrescentando-se solução salina, quando necessário. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em meio de cultura (RPMI 1640 acrescido de 2% de glicose) para utilização no ensaio.

Para a realização do ensaio antimicrobiano foi utilizado o meio de cultura Agar Mueller-Hinton para as bactérias e o meio sintético RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica)



tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (SIGMA), suplementado com 2% glicose para as leveduras, e placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça). Os extratos foram testados na concentração de 100 µg/mL, e todos os testes foram realizados em duplicata.

5 Em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 µL do extrato (dissolvidos em DMSO e água deionizada autoclavada), 25 µL de ágar Mueller-Hinton para as bactérias ou 25 µL de RPMI 1640 suplementado com 2% glicose para as leveduras e 50 µL de inóculo. Como controles positivos foram utilizados o cloranfenicol (Sigma) a 32 µg/mL para as bactérias e a anfotericina (Sigma) a 2 µg/mL para as leveduras. Ao final, o volume de cada  
10 poço foi 100 µL e as concentrações de DMSO 0,25% e extrato 250 µg/mL. As placas foram submetidas à agitação de 200 rpm por aproximadamente 20 minutos e incubadas a 35°C por 24 horas. Em todos os ensaios foram feitos os controles de toxicidade do DMSO, do crescimento fúngico/bacteriano, da esterilidade dos meios de cultura e da susceptibilidade às drogas controles.

15 Após incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico (MTT) (Amresco) a 5 mg/mL, homogeneizado e as placas novamente incubadas a 35°C por 4 horas. Posteriormente, foram acrescentados a cada poço 100 µL de SDS/Isopropanol 5% (50g de Dodecil Sulfato de Sódio, 200 mL água deionizada autoclavada, 500 mL q.s.p. isopropanol PA, pH 5,4), e então as placas foram  
20 homogeneizadas rigorosamente. 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), a um comprimento de onda 570 nm. A absorbância dos poços testes foi comparada com a absorbância do controle de micro-organismo, sendo a porcentagem de inibição calculada por meio da fórmula abaixo, em que DO\* refere-se à  
25 densidade óptica dos poços:

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

30 Arbitrariamente, foram considerados ativos os extratos com valor de inibição maior ou igual que 70%. Estes foram testados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### 4.6.1.2 Ensaio antimicrobiano contra *Cladosporium sphaerospermum*

35

Para o ensaio contra o fungo filamentoso *C. sphaerospermum* CCT1740, este foi previamente crescido em BDA a 25 °C por 7 a 10 dias. Para o preparo do inóculo, uma alçada bem carregada de esporos foi suspensa em 10 mL de solução salina estéril 0,85% (0,145 mol/L). A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 15% de transmitância a 620nm, o que corresponde a 10<sup>6</sup> esporos/mL. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 50 vezes em meio de cultura RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) para utilização no ensaio. Os extratos foram testados na concentração de 100 mg/mL, e todos os testes foram realizados em duplicata. Em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 µL do extrato (dissolvidos em DMSO e diluídos em água deionizada autoclavada para a concentração de 1 mg/mL), 25 µL do meio de cultura e 50 µL do inóculo. Como controle positivo foi utilizado Benomyl (Sigma) a 1,16 µg/mL. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µL e as concentrações de DMSO 0,25% e extrato 250 µg/mL. Ao final do processo as placas foram submetidas à agitação por aproximadamente 20 minutos a 200 rpm. Posteriormente, foram incubadas a 25°C por 48 horas. A leitura foi realizada em leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), a um comprimento de onda 620 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do controle de micro-organismo não tratado. Arbitrariamente foram considerados ativos os extratos com valor de inibição maior ou igual que 70%. Estes foram testados para cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### 4.6.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos ativos, na primeira coluna do poço teste (coluna 2) foram inoculados 100 µL do extrato (dissolvidos em DMSO e diluídos em meio de cultura para a concentração de 500 µg/mL), 50 µL do meio de cultura (coluna 3 a 11) e 50 µL do inóculo (coluna 2 a 11). Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas a partir da coluna 2 até a coluna 11. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µL, as concentrações de DMSO 0,1% e os extratos variaram de 250 µg/mL a 0,488 µg/mL. O meio de cultura, a padronização do inóculo, os controles positivos e negativos e a leitura dos resultados foram realizados conforme descrito acima na triagem da atividade antimicrobiana, para os respectivos micro-organismos alvos.

## 4.6.2 Triagem da atividade anticâncer, antiparasitária e antiviral

### 4.6.2.1 Ensaio com células tumorais humanas

O efeito dos extratos sobre a proliferação celular foi avaliado utilizando-se as  
5 linhagens tumorais humanas MCF-7 (glândula mamária) e TK-10 (renal) (Monks *et al.*,  
1991). De acordo com dados do NCI (*National Cancer Institute*), estas linhagens são  
capazes de detectar 95% dos extratos que contém substâncias antitumorais. De forma  
breve, as suspensões celulares foram diluídas de acordo com a linhagem, de modo que 100  
10  $\mu\text{L}$  colocados em cada poço de uma placa de 96 poços continham em torno de 15.000  
células. Os inóculos foram incubados por 24 horas a 37 °C para estabilização. As células  
foram incubadas na presença dos extratos por 48 horas em atmosfera de  $\text{CO}_2$  e 100% de  
umidade. A multiplicação destas células foi medida pelo método colorimétrico empregando a  
sulforrodamina 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  
15 multiplicação celular em pelo menos 70% foram selecionados como ativos. Os testes foram  
realizados em triplicatas e com controles positivos representados por drogas anticâncer.

### 4.6.2.2 Ensaio *in vitro* com a forma amastigota-like de *Leishmania amazonensis*

20 Culturas axênicas da forma amastigota-like de *Leishmania amazonensis*,  
previamente caracterizadas por meio de eletroforese de isoenzimas e depositadas no banco  
de cepas da 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. Amastigotas são semeadas a  $10^8$   
25 parasitos/mL e deixadas em meio apropriado, na presença ou não dos extratos em  
diferentes concentrações para cálculo da concentração inibitória mínima ( $\text{IC}_{50}$ ) e drogas  
controle. Após 72 horas a atividade dos extratos testados sobre as amastigotas nos poços  
teste foi mensurada pelo método colorimétrico do MTT (Sigma/USA). A absorbância dos  
poços testes foi comparada com as absorbâncias dos controles com e sem drogas de  
30 referência (Anfotericina B). Foram considerados ativos os extratos capazes de inibir acima  
de 70% a proliferação dos parasitas.

#### 4.6.2.3 Ensaio *in vitro* sobre formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*

Os extratos foram testados por meio do ensaio colorimétrico desenvolvido por Buckner *et al.* (1996), com modificações. Este ensaio utiliza uma cepa de *T. cruzi* (Tulahuen) transformada para expressar beta-galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o cloro-phenolred beta-D-galactopyranoside (CPRG) é utilizado como substrato. Para a triagem dos extratos, o ensaio foi realizado da seguinte forma: 4.000 células L929 por poço foram inoculadas em placas de 96 poços, seguido de incubação *overnight* em estufa a 37 °C para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi realizada com 10 parasitas/célula durante 2 horas. Após esse período, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37 °C durante 48 horas. O meio de cultura foi substituído por 160 µL de meio novo, além dos extratos naturais diluídos numa concentração de 20 µg/mL ou 10 µM em 40 µL de DMSO 5% em meio, e a placa incubada a 37 °C por 96 h. Após esse período, foi adicionado o substrato CPRG aos poços, a placa incubada a 37 °C, e a leitura realizada após 16-20 horas em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. Em paralelo, foram utilizados os seguintes controles: células não infectadas, células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1 µg/mL (3,81 µM) (controle positivo) e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1% (controle negativo). Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução da absorbância dos poços experimentais em comparação com a absorbância dos poços com células infectadas não tratadas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### 4.6.2.4 Ensaio antiviral contra Dengue vírus 2

Para realização do ensaio antiviral contra o vírus da Dengue 2 (DEN-2), monocamadas de células de rim de camundongos jovens (BHK-21) foram cultivadas em placas de 96 poços, utilizando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS), 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B e foram expostas a diferentes concentrações de extratos fúngicos, durante 72 horas na presença de DEN-2. Os extratos fúngicos foram preparados a 2 mg/mL em 10% de DMSO. A suspensão de vírus multiplicou-se até infecção ( $\text{moi} = 5$ ) e os extratos, em concentrações que variam de 100-0,78 µg/mL foram simultaneamente adicionados às placas, em duas repetições. Os controles para as células não infectadas (células não tratadas), vírus (células

infectadas não tratadas), na presença ou não de DMSO foram executados em paralelo, durante cada experiência. A atividade antiviral foi avaliada pelo sistema de efeito citopático característico (CPE), causada pelo vírus da dengue 2 observado por microscopia óptica (TANG *et al.*, 2012), seguido por ensaio colorimétrico utilizando MTT (Sigma-EUA) (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 1999). Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição de CPE em relação aos controles sem extratos. Todos os ensaios antivirais foram repetidos pelo menos três vezes.

#### 4.6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de frações e substâncias

Para posterior avaliação das frações e substâncias obtidas da purificação dos extratos selecionados para o fracionamento biomonitorado, foram realizados ensaios biológicos na plataforma do *National Center for Natural Products Research, na University of Mississippi*, EUA. Para esses experimentos foram utilizados os micro-organismos obtidos da *American Type Culture Collection* ATCC (Manassas, VA) e testados utilizando versões modificadas do CLSI (anteriormente NCCLS) métodos (NCCLS-M27-A2, 2002; NCCLS-M7-A7, 2006; NCCLS-M24-A, 2003; NCCLS-M38-A, 2002). Como micro-organismos alvo foram utilizados as linhagens de *Candida albicans* ATCC90028, *C. glabrata* ATCC90030, *C. krusei* ATCC6258, *Cryptococcus neoformans* ATCC90113, *Aspergillus fumigatus* ATCC204305, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, resistente à meticilina, *S. aureus* ATCC33591 (MRS), *Escherichia coli* ATCC35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e *Mycobacterium intracellulare* ATCC23068. *Mycobacterium intracellulare* foi testado utilizando um método modificado a partir de Franzblau *et al.* (1998).

As amostras foram diluídas pelo método de diluição seriada a 20% em DMSO/salina (0,75%) e transferidas para microplacas de 96 poços de fundo plano, em duplicata. Para a triagem, os extratos brutos foram testados a 50 µg/mL. Enquanto que a concentração dos controles positivos foi 1µg/mL da ciprofloxacina (ICN Biomedicals, EUA) para as bactérias e 5 µg/mL da anfotericina B (ICN Biomedicals, EUA) para fungos. Os inóculos microbianos foram preparados a fim de corrigir a densidade óptica a 630 nm das suspensões de células preparadas em caldo. Como a leitura foi realizada em leitor de microplaca Biotek Powerwave XS (Bio-Tek Instruments, EUA) a um comprimento de onda de 530 nm. Para os fungos *M. intracellulare* e *A. fumigatus* foi utilizado o leitor de microplacas PolarstarGalaxy (BMG Lab Technologies, Alemanha) antes e após incubação. As temperaturas e tempos de incubação variaram de acordo com os diferentes micro-organismos: 35 °C por 46-50 horas para *Candida* spp.; 35 °C por 16-20 h para *Staphylococcus* spp., *E. coli*, e *P. aeruginosa*; 35 °C por 70-74 horas para *C. neoformans*; 35 °C por 46-50 horas para *A. fumigatus*; e 37 °C e

10% de CO<sub>2</sub> por 70-74 horas para *M. intracellulare*. Para cálculo da CI<sub>50</sub> das frações e substâncias, os mesmos foram testados nas concentrações de 20 a 0,8 µg/mL, enquanto que os controles positivos ciprofloxacina a 1 - 0,001 µg/mL e a anfotericina B a 5-0,005 µg/mL. A porcentagem de crescimento e a concentração testada foram representadas graficamente para se obter o valor CI<sub>50</sub>.

#### 4.7 Seleção dos extratos para análise química

Após as confirmações dos ensaios biológicos realizados, os extratos considerados ativos foram inicialmente submetidos à Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) H<sup>1</sup> para posterior fracionamento químico biomonitorado a fim de posteriormente isolar e/ou identificar os metabólitos ativos. Os experimentos descritos a seguir foram realizados nas dependências do *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* do *United States Department of Agriculture* (ARS/NPURU/USDA) sob orientação do Dr. Charles Cantrell (Químico) e colaboração de técnicos especializados.

#### 4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os extratos, frações e substâncias puras com atividade biológica foram analisados para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C obtidos utilizando o aparelho Inova 600 MHz Varian (Palo Alto, CA). As amostras foram preparadas a aproximadamente 10 mg/mL em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e analisadas em tubos de RMN de 3 mm. Todos os espectros de RMN foram processados pelo programa MestRe Nova v8.1.2-11880 (Mestre lab Research, S. L., 2013).

#### 4.9 Fracionamento químico biomonitorado

Após a análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, os extratos brutos selecionados com grupos químicos de interesse, por exemplo compostos aromáticos, foram submetidos ao fracionamento químico biomonitorado visando à purificação e identificação dos prováveis metabólitos responsáveis pela atividade biológica. Inicialmente, realizou-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do(s) extrato(s) bruto(s) a fim de selecionar os solventes para o fracionamento. As análises de CCD foram realizadas em sílica gel (Uniplat) como fase estacionária e um painel de misturas de solventes como fase móvel. As placas foram a

princípio reveladas pela luz UV e também pelo calor após aplicação de spray de Godin (Godin A, 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em etanol mais Godin B, 1 g de vanilina em 100 mL de etanol). A cromatografia em coluna dos extratos foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage@Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). Foi utilizada a  
5 coluna Snap 100 g e um fluxo de 40 mL/min.

#### 4.10 Elucidação estrutural dos constituintes químicos

A identificação das moléculas presente(s) nas frações ativas foi realizada pelo  
10 químico Dr. Charles Cantrell (*Natural Products Utilization Research*). Foram utilizadas as análises e junção dos dados obtidos a partir dos seguintes experimentos: espectroscopia de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas a um espectrômetro de massas, somado a pesquisas realizadas em banco de dados comerciais, como *Dictionary of Natural Products* e *SciFinder Scholar*.

15

#### 4.11 Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos

Os extratos brutos e frações com presença majoritária de ácidos graxos a partir dos espectros de RMN <sup>1</sup>H foram submetidos à análise quantitativa e qualitativa destas  
20 substâncias por Cromatografia Gasosa em Análise com Detector por Ionização de Chama (GC-FID).

##### 4.11.1 Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

As análises cromatográficas foram conduzidas em um cromatógrafo a gás Varian (modelo CP-3800), o qual foi equipado com detector de ionização de chama, uma coluna capilar DB-23 Agilent Technologies (comprimento: 60 m; diâmetro interno: 0,25 mm; espessura do filme: 0,25 µm). Durante a operação utilizou-se a seguinte condição:  
25 temperatura de injeção, 270 °C; temperatura da coluna, 130 °C mantido por 1 minuto  
30 seguido de um gradiente de 130° a 170 °C a 6,5 °C/min, seguido de gradiente de 170° a 215 °C a 2,8 °C/min e mantido por 12 min seguido por 215° a 230 °C por 40 °C/min e mantido por 3 minutos; volume de injeção de 1µL (*split* 20:1); 3,0 mL/min de He a um fluxo constante; temperatura FID de 300 °C.

Os ácidos graxos das amostras em estudo foram quantificados pelo cálculo da  
35 porcentagem da área baseado na combinação da área total: a área de cada pico obtido foi

dividida pela área total de todos os picos do cromatograma e multiplicado por 100, a fim de obter a porcentagem.

#### 4.11.2 Identificação dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

5

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos constituintes da amostra em questão (extratos brutos e frações ativas), com uma mistura constituída de 40 padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos, os quais foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) ou Nu-ChekPrep, Inc. (Elysian, MN). Ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês FAME) utilizados na análise das amostras foram sintetizados a partir de um ácido graxo livre correspondente (reação com diazometano) ou analisados com uma mistura de padrões de referência da Supelco 18919 (St. Louis, MO).

Os tempos de retenção dos “FAME” utilizados neste trabalho estão identificados em parêntese: ácido capróico (6:0), ácidocaprílico (8:0), ácido cáprico (10:0), ácido undecanóico (11:0), ácido láurico (12:0), ácido tridecanóico (13:0), ácido mirístico (14:0), ácido miristoléico (14:1), ácido pentadecanóico (15:0), ácido cis-10-pentadecenóico (15:1), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoléico (16:1), ácido heptadecanóico (17:0), ácido cis-10 heptadecenóico (17:1), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1n9c), ácido elaídico (18:1n9t), (LA) ácido linoléico (18:2n6c), ácido linolelaídico (18:2n6t), ácido gamma-linolênico (18:3n6), ácido pinolênico (18:3n6), ácido estearidônico (18:4n3), (ALA) ácido alpha-Linolênico (18:3n3), ácido nonadecanóico (19:0), ácido araquídico (20:0), ácido cis-11-eicosenóico (20:1), ácido cis-11-14-eicosadienóico (20:2), ácido heneicosanóico (21:0), ácido siadônico (20:3n6), ácido cis-8-11-14-eicosatrienóico (20:3n6), ácidoarachidônico (20:4n6), (ETE) cis-11,14,17-ácido eicosatrienóico (20:3n3), (EPA) ácido eicosapentaenóico (20:5n3), ácido beénico (22:0), ácido erúxico (22:1n9), ácido cis-13,16-Docosadienóico (22:2), (DPA) ácido docosapentaenóico (22:5n3), (DHA) ácido docosahexaenóico (22:6n3), ácido tricosanóico (23:0) e ácido lignocérico (24:0).

#### 30 4.11.3 Reação de diazotação – produção de ésteres metílicos dos ácidos graxos

Os ácidos graxos livres foram convertidos ao seu éster metílico correspondente pela reação com diazometano em éter, sendo utilizado um Mini Diazald®, aparato da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). A reação foi realizada por um técnico especializado, resumidamente 35 2,5 g de KOH foram dissolvidos em 4 mL de água deionizada e a mistura mantida em um recipiente, sendo posteriormente adicionados 5 mL de etanol a mistura. Um funil de adição



contendo 2,5 g de *diazald* dissolvido em 22,5 mL de éter foi acoplado ao recipiente, o qual foi aquecido a 65 °C em banho maria. Durante o aquecimento, por um período de 50 minutos, a solução de *diazald* foi gotejada na mistura em aquecimento. Após este período, o frasco foi resfriado utilizando um banho de acetona e gelo seco. O diazometano co-destilado (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) em solução de éter foi armazenado em frasco de vidro e mantido a -20 °C para posterior uso.

Para a análise, a cada amostra de extrato ou fração ativa foram adicionados 500 µL de éter dietil e 500 µL da solução de CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. O frasco com a solução foi mantido aberto, a temperatura ambiente e overnight em uma capela de exaustão, a fim de completar a reação e permitir a evaporação do solvente e CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Após a reação o produto éster metílico foi dissolvido em 500 µL de éter dietil e analisado em CG-EM.

#### 4.12 Avaliação da resistência a UV-C

Os experimentos de astrobiologia foram realizados no Laboratório de Astrobiologia IAG – NAP Astrobio, USP, Brasil, sob orientação do Dr. Douglas Galante e Dr. Fabio Rodrigues. O experimento de resistência a UV-C das leveduras teve como controle negativo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, utilizada como um modelo de baixa resistência e, como controle positivo, a levedura *Exophiala* sp. 15LV1 (PULSCHEN *et al.*, 2015), usada como um modelo de alta resistência.

As leveduras foram crescidas em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5% e extrato de malte 1% Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%), sob agitação de 150 rpm, a 15 °C, até uma densidade óptica de DO<sub>595 nm</sub> = 0,6 a 0,8, para preparação do inóculo. Então, o *pellet* foi lavado duas vezes com solução 0,9% de NaCl. Ao final, o *pellet* foi solubilizado em solução salina e a suspensão resultante ajustada para a concentração final de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> células/mL. Dez mL da suspensão de células foram transferidos para placas de Petri (70 mm de diâmetro) e irradiados utilizando lâmpadas de mercúrio Philips TUV-20W de baixa pressão (com pico de emissão em 253,7 nm), sob agitação. A radiação foi monitorada durante todo o experimento por meio de um dosímetro calibrado RMX-3W (Vilber Lourmat, França) e fotocélulas de UV-C CX-254 (Vilber Lourmat, França). O fluxo de UV-C medido durante o experimento foi de 6,0 W/m<sup>2</sup> e as amostras foram colocadas a uma distância de 25 cm da lâmpada. Nenhuma variação significativa de temperatura que poderia afetar a sobrevivência das células foi detectada na solução, durante o experimento. Após as diferentes doses de exposição (300, 600 e 900 J/m<sup>2</sup>), 10 µL da suspensão de células foram diluídos até 10.000 vezes, inoculados em meio YM e as placas foram incubadas a 15 °C no escuro. As contagens foram realizadas até a menor diluição onde foi possível visualizar as UFC separadamente. Os experimentos

foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos pela média da razão entre a contagem de UFC/mL após a irradiação e a contagem de UFC/mL no tempo de exposição igual a 0 ( $N/N_0$ ), o controle não-irradiado. Foram consideradas resistentes as leveduras capazes de crescer após uma dose de radiação maior do que  $600 \text{ J/m}^2$ . As leveduras consideradas capazes de resistir à radiação UV-C foram avaliadas em relação à exposição à radiação ambiental, a capacidade de foto reparo, resistência a dessecação, salinidade e caracterização de pigmentos por meio de espectroscopia Raman.

#### 4.13 Avaliação da resistência a UV ambiental

10

Com o objetivo de simular as condições de radiação ultravioleta encontradas no ambiente natural, as leveduras mais resistentes ao UV-C foram expostas à radiação ambiental em suspensões de células preparadas como descrito abaixo. Para isso foi utilizado o simulador solar SOL UV-2 (Oriental Newport, EUA), com emissão a partir de 280 nm, sendo que 85,7% da emissão são de radiação UV-A, 11% de UV-B e 3,3% de luz visível. O fluxo durante o experimento foi de  $100,6 \text{ Wm}^{-2}$  de UV-A (365 nm) e  $61,9 \text{ Wm}^{-2}$  de UV-B (312 nm), medido pelo dosímetro (Vilber Lourmat, França) com fotocélulas de UV-A CX-365 e UV-B CX-312 nm (Vilber Lourmat, França). Ao contrário da lâmpada de UV-C, que possui emissão em linha, o simulador solar possui um espectro contínuo, simulando a irradiação solar que chega à superfície da Terra. Como os dosímetros são calibrados para medir em uma faixa ao redor de 312 e 365 nm, os valores medidos correspondem apenas a essas regiões, e não ao fluxo total de UV-A e B.

20

Os controles negativos e positivos utilizados também foram os mesmos utilizados no ensaio de resistência a radiação UV-C. O inóculo foi preparado a partir do crescimento em caldo GYMP conforme descrito acima, de forma que a solução resultante foi ajustada para  $10^6$  a  $10^7$  células/mL. Dez mL da suspensão de células foram transferidos para placas de Petri de vidro (30 mm de diâmetro) e foram então expostas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, em temperatura de aproximadamente  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após a exposição,  $10 \text{ }\mu\text{L}$  da suspensão de células foram diluídos até a diluição  $10^{-4}$  e inoculados em meio YM. As placas foram incubadas a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  e os experimentos foram feitos em duplicata. A sobrevivência foi calculada pela contagem de UFC, e os resultados expressos conforme já descrito acima.

25

30

#### 4.14 Espectroscopia de Raman e avaliação de pigmentos

Para investigar a presença de pigmentos fotoprotetores, principalmente melanina e carotenóides, as leveduras foram submetidas à análise por meio da espectroscopia Raman. Esta técnica tem sido bastante utilizada para estudos em astrobiologia e exploração espacial (EDWARDS *et al.*, 2012), sobretudo por sua portabilidade e por ser uma técnica não destrutiva e que não necessita de preparo prévio da amostra. Foi utilizado um espectrômetro micro-Raman Renishaw modelo InVia com lasers para excitação em 633 e 785 nm, objetiva de 20X e detector CCD, e um equipamento Bruker RFS 100/S FT-Raman, com laser de excitação em 1064 nm e detector de Ge resfriado por N<sub>2</sub> líquido. As amostras foram analisadas por meio de esfregaço da colônia das leveduras selecionadas em lâminas de vidro. Para evitar danos térmicos e fotodegradação das amostras, utilizou-se baixa potência no laser incidente.

#### 4.15 Avaliação da resistência à salinidade

A resistência à salinidade foi avaliada pelo crescimento celular em meio de cultura acrescido de NaCl medido por meio da densidade óptica (DO<sub>595 nm</sub>) em um espectrofotômetro (Eppendorf BioPhotometer plus, EUA). Para tal, as leveduras foram inoculadas em tubos contendo caldo GYMP, em concentrações de NaCl variando entre 0,5; 1,0; 1,5; 1,75 e 2,0 M, sob agitação de 150 rpm, a 15 °C. Após 24, 48, 72 e 96 horas, alíquotas da suspensão celular foram retiradas e tiveram sua absorvância medida. Os experimentos foram realizados em duplicata. A curva de crescimento foi realizada a partir da medida do inóculo no tempo zero.

### 5. Resultados

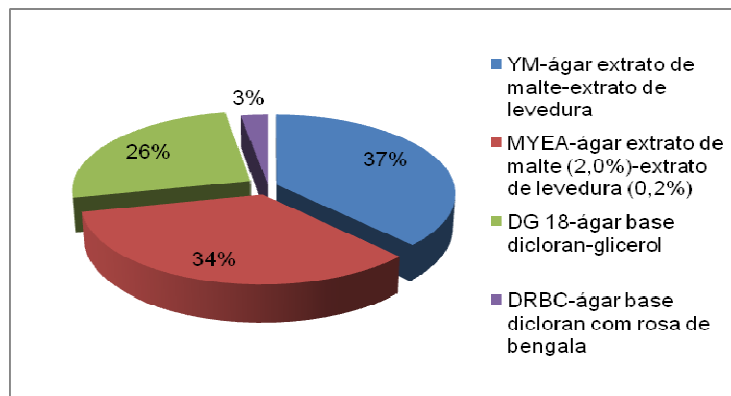
Para facilitar as análises dos dados obtidos, os resultados deste trabalho seguem apresentados em forma de capítulos, os quais serão publicados em revistas indexadas de circulação internacional. A redação e estruturação dos artigos, bem como a submissão estão em andamento. Os trabalhos estão divididos por áreas de estudo como apresentado abaixo:

- (1) Fungos habitantes de rochas de Campo de Altitude da RPPN Santuário do Caraça, Minas Gerais, Brasil,
- (2) Fungos habitantes de rochas do Deserto do Atacama, Chile,
- (3) Fungos habitantes de rochas da Antártica continental.

## 5.1 Fungos habitantes de rochas de Campo de Altitude da RPPN do Caraça, Minas Gerais, Brasil

### 5.1.1 Amostragem e Isolamento dos fungos

5 Após a expedição de campo na RPPN Santuário do Caraça, em Junho de 2011, foram obtidos 15 fragmentos de rochas amostrados no Pico do Sol a 2.085 m de altitude. Dos 15 fragmentos de rochas foram obtidos 292 isolados fúngicos, dos quais 255 caracterizados como fungos filamentosos e 37 como leveduras, com contagens entre 100 a >300 UFC/g (Tabela 1). Houve crescimento de fungos em todos os meios de cultura utilizados (Figura 2). No meio YM apresentou densidade de 37%, seguido do MYEA (34%) e DG-18 (26%); por outro lado, no meio DRBC foi obtido a menor densidade (3%).



**Figura 2:** Proporção (%) de isolados fúngicos obtidos nos diferentes meios de cultura utilizados no processamento das amostras de rochas coletadas no Campo de Altitude na região da serra do Caraça.

### 5.1.2 Identificação e análise da diversidade dos fungos

15

Os 292 isolados fúngicos obtidos foram agrupados em 150 morfotipos distintos, os quais foram então submetidos à amplificação das regiões pre-determinadas do rRNA para posterior sequenciamento e identificação das espécies. Após o sequenciamento de regiões do rRNA foram caracterizados 69 táxons, distribuídos em 46 gêneros (Tabela 1, Figuras 4, 5 e 6) e sete classes (Figura 3), pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. A classe com o maior número de isolados foi *Dothideomycetes* (44%), representada pelos gêneros *Acrocalyma*, *Alternaria*, *Arthrocatena*, *Biatrispora*, *Bipolaris*, *Camarosporium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Devriesia*, *Diplodia*, *Flavomyces*, *Letendraea*, *Lophiostoma*, *Montagnula*,

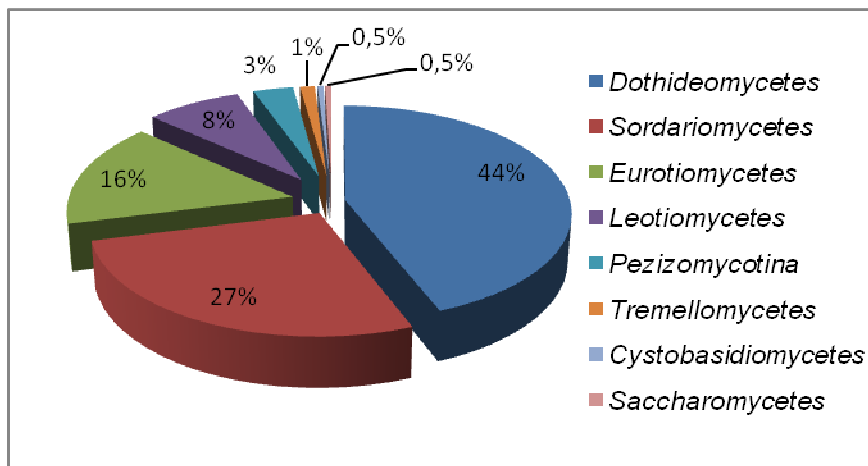
20

*Neophaeothecoidea*, *Paraconiothyrium*, *Paraphaeosphaeria*, *Phaeosphaeria*, *Prosthemium*, *Pseudotaeniolina*, *Rousoella* e *Toxicocladosporium*. Alguns isolados desta classe foram identificados em nível de família (*Didymosphaeriaceae* sp., *Massarinaceae* sp. e *Teratosphaeriaceae* sp.) e classe (*Dothideomycetes* sp.). A classe *Sordaryomycetes*, com 5 27% dos isolados, abrigou os gêneros *Acremonium*, *Anthostomella*, *Arthrinium*, *Coniochaeta*, *Hypoxylon*, *Lecythophora*, *Microcera*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Pilidiella* e *Trichoderma*. Dentro da classe *Eurotiomycetes* (16%) foram incluídos os gêneros *Aspergillus*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e um táxon identificado como *Herpotrichiellaceae* sp. As classes *Leotiomycetes* (8%) e o subfilo 10 *Pezyzomicotina* (3%) foram representadas pelos táxons *Catenulifera* sp. e *Pezyzomicotina* sp., respectivamente. A classe *Tremellomycetes* (1%) foi representada pelos gêneros *Bandoniozyma*, *Bullera* e *Cryptococcus*; já a classe *Cystobasidiomycetes* (0,5%) pelo gênero *Cystobasidium*, formado por leveduras basidiomicéticas. A classe *Saccharomycetes* incluiu uma levedura pertencente ao gênero *Picchia*.

15 Dentre os táxons encontrados, aqueles que apresentaram o maior número de isolados foram *Catenulifera* sp. (7,8%) e *Neophaeothecoidea* sp. (7%) com contagens de 247,3 e >300 UFC/g, respectivamente. Já os táxons minoritários, aqueles representados por apenas um isolado (singletos), totalizaram 28 (11,6%). Cinquenta e um (17,5%) isolados obtidos de rochas do Campo de Altitude da Serra do Caraça não puderam ser identificados.

20 Para os índices de diversidade (Fisher's  $\alpha$ ), riqueza (Margalef's) e dominância (Simpson's) foram encontrados os seguintes valores, 9,17, 6,98 e 0,96, respectivamente, sendo que todos eles estão coerentes com os intervalos de confiança de 95% de *bootstrap*. Os valores dos índices de diversidade sugerem a presença de uma rica e diversificada comunidade de fungos presentes em rochas no Campo de Altitude da Serra do Caraça. 25 Apesar de alguns táxons apresentaram contagens  $\geq 300$  UFC/g, o índice de Simpson ( $1 - D$ ) apresentou valor próximo de 1, o que indica uma alta diversidade e uma baixa dominância.

O esforço amostral da comunidade de fungos de rochas do Campo de Altitude da região da serra do Caraça foi avaliado por meio de curva de rarefação de táxons, que representa o número de táxons em função da densidade de amostras avaliadas (Figura 7). 30 A curva atingiu uma assíntota, indicando que a diversidade total (riqueza e composição de espécies) foi obtida.



**Figura 3:** Distribuição (%) dos isolados obtidos em nível de classe a partir de rochas do Campo de Altitude na região da serra do Caraça.

**Tabela 1:** Identificação molecular dos fungos obtidos de rochas do Campo de Altitude na RPPN Santuário do Caraça.

Código do UFMGCB <sup>a</sup>	Densidade (UFC/g)	Resultado Top BLAST [n° de acesso do GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto <sup>f</sup>
6979	>300	<i>Arthrocatena tenebrio</i> [KF309948] <sup>b</sup>	37	93	537	<i>Arthrocatena</i> sp.
7037	>300	<i>Cladophialophora boppii</i> [EU103997] <sup>b</sup>	97	89	458	<i>Cladophialophora</i> sp.
7090	>300	<i>Devriesia tardicrescens</i> [JF499840] <sup>b</sup>	97	96	387	<i>Devriesia</i> sp.
6976	>300	<i>Cladophialophora modesta</i> [NR121459] <sup>b</sup>	99	81	563	<i>Herpotrichiellaceae</i> sp.
08BDG-2	>300	<i>Neophaeothecoidea proteae</i> [KF937228] <sup>e</sup>	100	97	509	<i>Neophaeothecoidea</i> sp.
7073	>300	<i>Paraconiothyrium archidendri</i> [JX496049] <sup>b</sup>	83	92	506	<i>Paraconiothyrium</i> sp. 1
6982	>300	<i>Cladosporium varians</i> [NR119856] <sup>b</sup>	100	99	470	<i>Pezizomycotina</i> sp. 1
		<i>Aspergillus marvanovae</i> [HE974387] <sup>c</sup>	100	92	528	
6986	>300	<i>Pseudotaeniolina globosa</i> [AY12870] <sup>b</sup>	86	93	443	<i>Pseudotaeniolina</i> sp.
6988	>300	<i>Teratosphaeria encephalarti</i> [FJ372395] <sup>b</sup>	100	89	496	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp.
13BYM-2	250	<i>Lecythophora fasciculata</i> [AF353598] <sup>e</sup>	100	99	506	<i>Lecythophora fasciculata</i>
7079	247,3	<i>Catenulifera brachyconia</i> [GU727557] <sup>b</sup>	100	94	503	<i>Catenulifera</i> sp.
7026	220	<i>Arthrimum kogelbergense</i> [NR120272] <sup>b</sup>	75	92	484	<i>Arthrimum</i> sp.
7162	220	<i>Coniochaeta africana</i> [GQ154539] <sup>b</sup>	99	96	538	<i>Coniochaeta</i> sp.
7138	200	<i>Acremonium exuviarum</i> [UAMH 9995] <sup>c</sup>	97	88	343	<i>Acremonium</i> sp.
7158	200	<i>Curvularia affinis</i> [KJ909780] <sup>b</sup>	99	99	405	<i>Curvularia</i> sp.

6978	200	<i>Microdiplodia hawaiiensis</i> [DQ885897] <sup>b</sup>	83	91	524	<i>Didymosphaeriaceae</i> sp. 1
7173	200	<i>Paraphaeosphaeria sardoa</i> [JX496094] <sup>b</sup>	73	92	545	<i>Didymosphaeriaceae</i> sp. 2
11BYM-4	200	<i>Exophiala oligosperma</i> [FJ358245] <sup>e</sup>	100	98	560	<i>Exophiala oligosperma</i>
7191	200	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> [AY642530] <sup>b</sup>	96	98	516	<i>Paraconiothyrium</i> sp. 2
7182	200	<i>Hypocrea hispanica</i> [JN715595] <sup>b</sup>	100	99	538	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>
6970	180	<i>Pestalotiopsis kenyana</i> [KM199302] <sup>b</sup>	100	100	548	<i>Pestalotiopsis telopeae</i>
7035	175	<i>Toxicocladosporium strelitziae</i> [NR111765] <sup>b</sup>	99	94	476	<i>Toxicocladosporium</i> sp.
7188	162,5	<i>Pestalotiopsis biciliata</i> [KM199308] <sup>b</sup>	100	99	537	<i>Pestalotiopsis australasiae</i>
7033	160	<i>Pestalotiopsis kenyana</i> [KM199302] <sup>b</sup>	99	100	484	<i>Pestalotiopsis kenyana</i>
7087	150	<i>Exosporium stylobatum</i> [JQ044428] <sup>b</sup>	75	86	531	<i>Dothideomycetes</i> sp.
7146	150	<i>Cosmospora cymosa</i> [NR111605] <sup>b</sup>	100	88	537	<i>Paecilomyces</i> sp.
7170	150	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i> [KJ939279] <sup>b</sup>	100	97	512	<i>Paraphaeosphaeria</i> cf. <i>parmeliae</i>
7030	150	<i>Cladosporium phaenocomae</i> [NR119950] <sup>b</sup>	100	99	482	<i>Pezizomycotina</i> sp. 2
		<i>Penicillium hetheringtonii</i> [GU944538] <sup>c</sup>	72	91	607	
7031	133,3	<i>Biatriospora mackinnonii</i> [KF015654] <sup>b</sup>	97	92	473	<i>Biatriospora</i> sp.
6956	133,3	<i>Montagnula aloes</i> [NR111757] <sup>b</sup>	100	90	498	<i>Montagnula</i> sp.
7145	133,3	<i>Pestalotiopsis colombiensis</i> [KM199421] <sup>c</sup>	98	99	437	<i>Pestalotiopsis colombiensis</i>
7063	125	<i>Aspergillus glaucus</i> [AY373887] <sup>b</sup>	100	99	509	<i>Aspergillus</i> sp. 1
		<i>Aspergillus cibarius</i> [JQ918180] <sup>c</sup>	97	100	398	

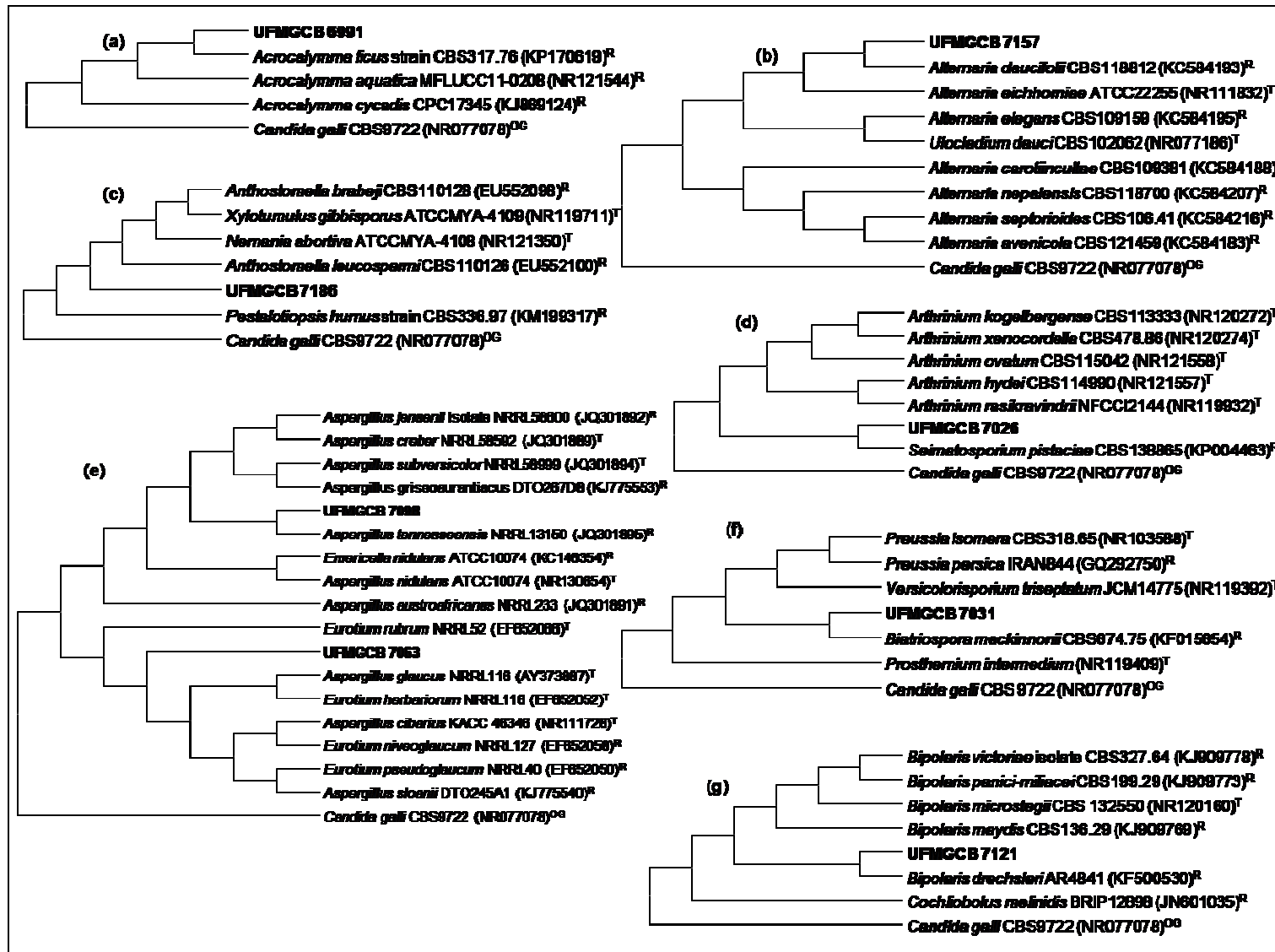


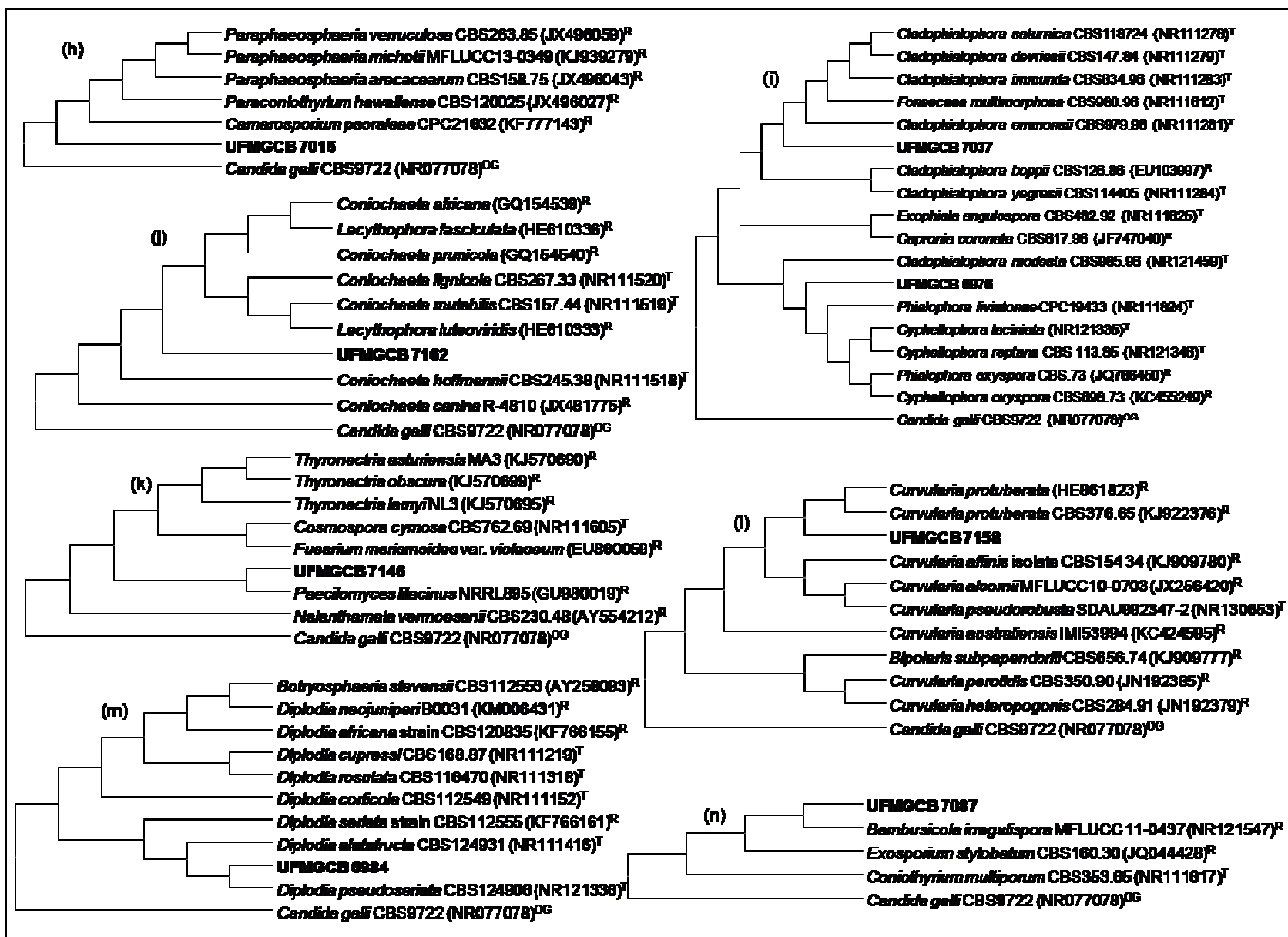
10BYM-3	120	<i>Exophiala bergeri</i> [FJ358240] <sup>e</sup>	100	98	525	<i>Exophiala bergeri</i>
		<i>Penicillium rubens</i> [NR111815] <sup>b</sup>	100	100	380	
7017	120	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> [JX996898] <sup>c</sup>	100	99	345	<i>Penicillium</i> sp. 1
		<i>Penicillium chrysogenum</i> [JX99666] <sup>d</sup>	100	99	813	
6991	100	<i>Acrocalymma ficus</i> [KP170619] <sup>b</sup>	99	94	507	<i>Acrocalymma</i> sp.
		<i>Acrocalymma ficus</i> [KP170687] <sup>c</sup>	77	100	413	
7157	100	<i>Alternaria daucifolii</i> [KC584193] <sup>b</sup>	100	100	394	<i>Alternaria daucifolii</i>
7186	100	<i>Anthostomella leucospermi</i> [EU552100] <sup>b</sup>	100	87	522	<i>Anthostomella</i> sp.
7098	100	<i>Aspergillus jensenii</i> [JQ301892] <sup>b</sup>	99	99	507	<i>Aspergillus</i> sp. 2
		<i>Aspergillus griseoaurantiacus</i> [KJ775086] <sup>c</sup>	100	96	363	
10AMY-5	100	<i>Bandoniozyma aquatica</i> [KC171328] <sup>e</sup>	100	92	449	<i>Bandoniozyma</i> sp.
7121	100	<i>Bipolaris drechsleri</i> [KF50053] <sup>b</sup>	100	97	511	<i>Bipolaris</i> cf. <i>drechsleri</i>
08CYM-5	100	<i>Bullera pseudoalba</i> [AF075504] <sup>e</sup>	100	95	528	<i>Bullera</i> sp.
7016	100	<i>Camarosporium psoraleae</i> [KF777143] <sup>b</sup>	64	88	517	<i>Camarosporium</i> sp.
7093	100	<i>Cladosporium flabelliforme</i> [NR119844] <sup>b</sup>	100	100	460	<i>Cladosporium asperulatum</i>
7189	100	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i> [NR119730] <sup>b</sup>	100	99	498	<i>Cladosporium</i> cf. <i>pini-ponderosae</i>
		<i>Cladosporium halotolerans</i> [EF101424] <sup>c</sup>	100	85	346	
15AYM-9	100	<i>Coniochaeta africana</i> [GQ154601] <sup>e</sup>	100	99	496	<i>Coniochaeta africana</i>
08CMY-6	100	<i>Cryptococcus podzolicus</i> [AF07548] <sup>e</sup>	100	99	508	<i>Cryptococcus podzolicus</i>
10AMY-4	100	<i>Cystobasidium slooffiae</i> [AF189965] <sup>e</sup>	100	99	491	<i>Cystobasidium slooffiae</i>

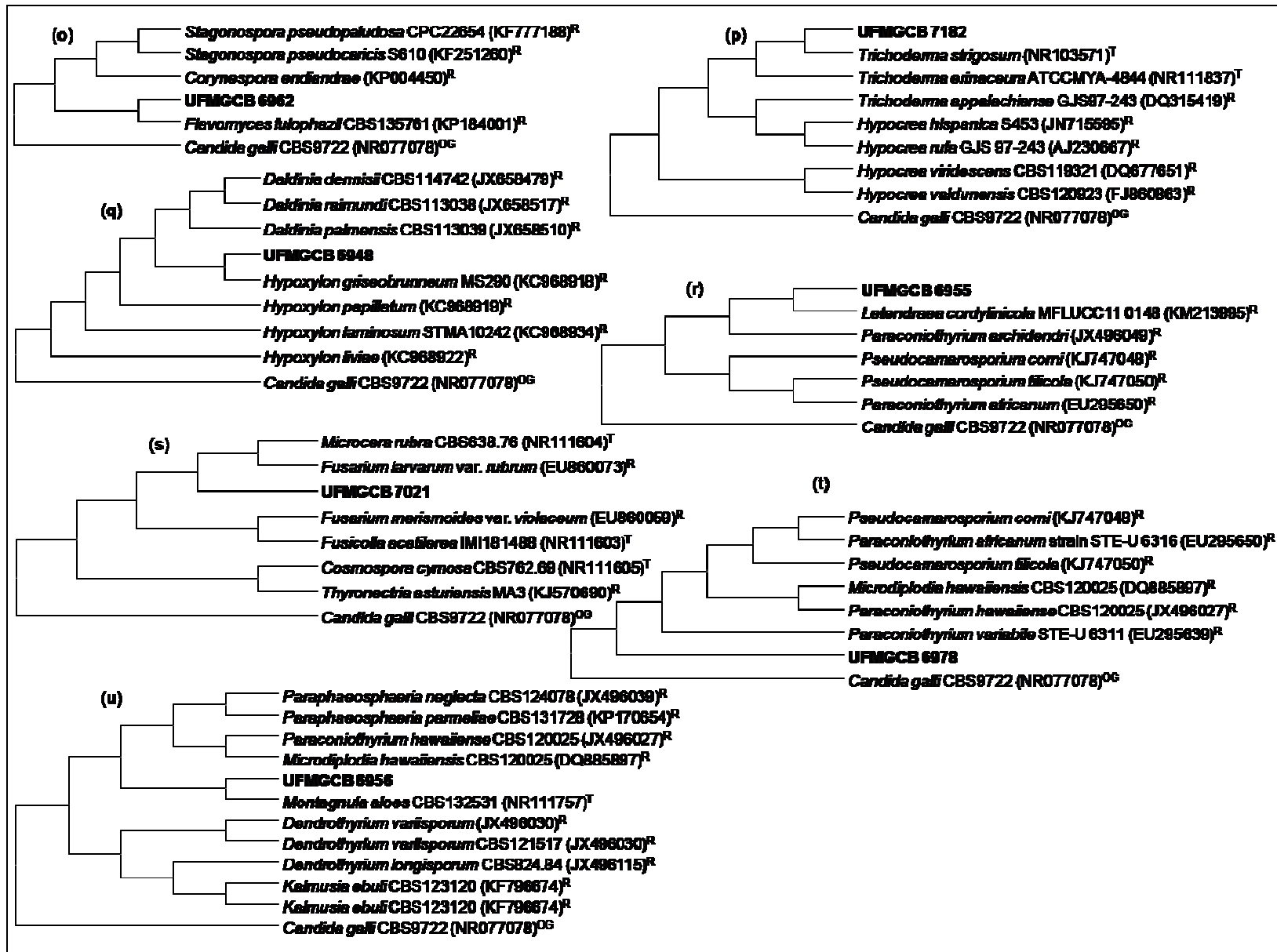
7054	100	<i>Pseudocamarosporium loniceræ</i> [KJ747047] <sup>b</sup>	80	92	544	<i>Didymosphaeriaceae</i> sp. 3
6984	100	<i>Diplodia pseudoseriata</i> [NR121336] <sup>b</sup>	100	100	449	<i>Diplodia pseudoseriata</i>
6962	100	<i>Flavomyces fulophazii</i> [KP184001] <sup>b</sup>	84	90	534	<i>Flavomyces</i> sp.
6948	100	<i>Hypoxyton griseobrunneum</i> [KC968918] <sup>b</sup>	82	99	509	<i>Hypoxyton</i> sp.
6955	100	<i>Letendreaa cordylinicola</i> [KM213995] <sup>b</sup>	100	98	559	<i>Letendreaa cordylinicola</i>
7153	100	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i> [KJ939279] <sup>b</sup>	46	94	508	<i>Lophiostoma</i> sp.
7096	100	<i>Stagonospora pseudopaludosa</i> [KF777188] <sup>b</sup>	86	89	550	<i>Massarinaceae</i> sp.
7021	100	<i>Microcera rubra</i> [NR111604] <sup>b</sup>	100	98	535	<i>Microcera</i> sp.
7050	100	<i>Neopestalotiopsis eucalypticola</i> [KM199376] <sup>b</sup>	100	99	515	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
6972	100	<i>Paraconiothyrium variabile</i> [EU295639] <sup>b</sup>	98	95	462	<i>Paraconiothyrium</i> sp. 3
7115	100	<i>Paraphaeosphaeria viridescens</i> [JX496085] <sup>b</sup>	86	89	496	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.
		<i>Penicillium nothofagi</i> [NR121518] <sup>b</sup>	100	100	503	
7185	100	<i>Penicillium kapuscinskii</i> [JX140955] <sup>c</sup>	100	98	451	<i>Penicillium</i> sp. 2
		<i>Penicillium westlingii</i> [JN606625] <sup>d</sup>	99	99	907	
7018	100	<i>Penicillium</i> sp. [KC427191] <sup>b</sup>	100	100	551	<i>Penicillium</i> sp. 3
		<i>Penicillium brevicompactum</i> [DQ645784] <sup>c</sup>	97	98	424	
6985	100	<i>Pestalotiopsis hollandica</i> [KM199388] <sup>c</sup>	100	96	391	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1
7120	100	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [JQ845945] <sup>c</sup>	97	100	425	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2
7061	100	<i>Phaeosphaeria podocarp</i> [KP004452] <sup>b</sup>	100	95	496	<i>Phaeosphaeria</i> sp.

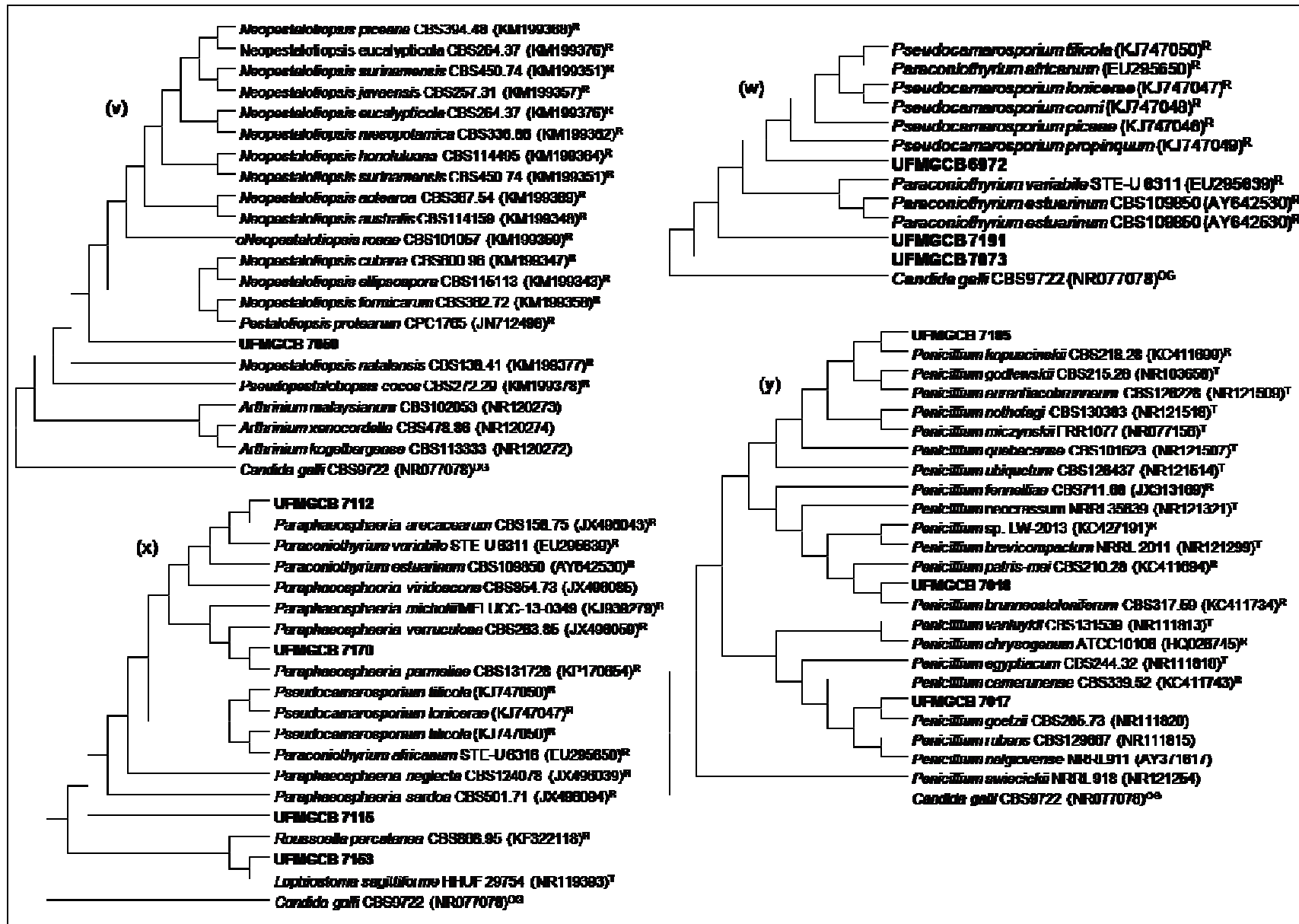
7128	100	<i>Peyronellaea prosopidis</i> [KF777180] <sup>b</sup>	100	97	507	<i>Phoma</i> sp.
05CDG-2	100	<i>Pichia caribbica</i> [EU348786] <sup>e</sup>	100	100	498	<i>Pichia caribbica</i>
7139	100	<i>Pilidiella tibouchinae</i> [NR111706] <sup>b</sup>	100	97	550	<i>Pilidiella tibouchinae</i>
7124	100	<i>Quadricrura bicornis</i> [NR119400] <sup>b</sup>	90	84	504	<i>Prosthemium</i> sp.
7047	100	<i>Roussoella chiangraina</i> [KJ474828] <sup>b</sup>	97	93	383	<i>Roussoella</i> sp. 1
7045	100	<i>Roussoella japonensis</i> [KJ474829] <sup>b</sup>	84	90	568	<i>Roussoella</i> sp. 2

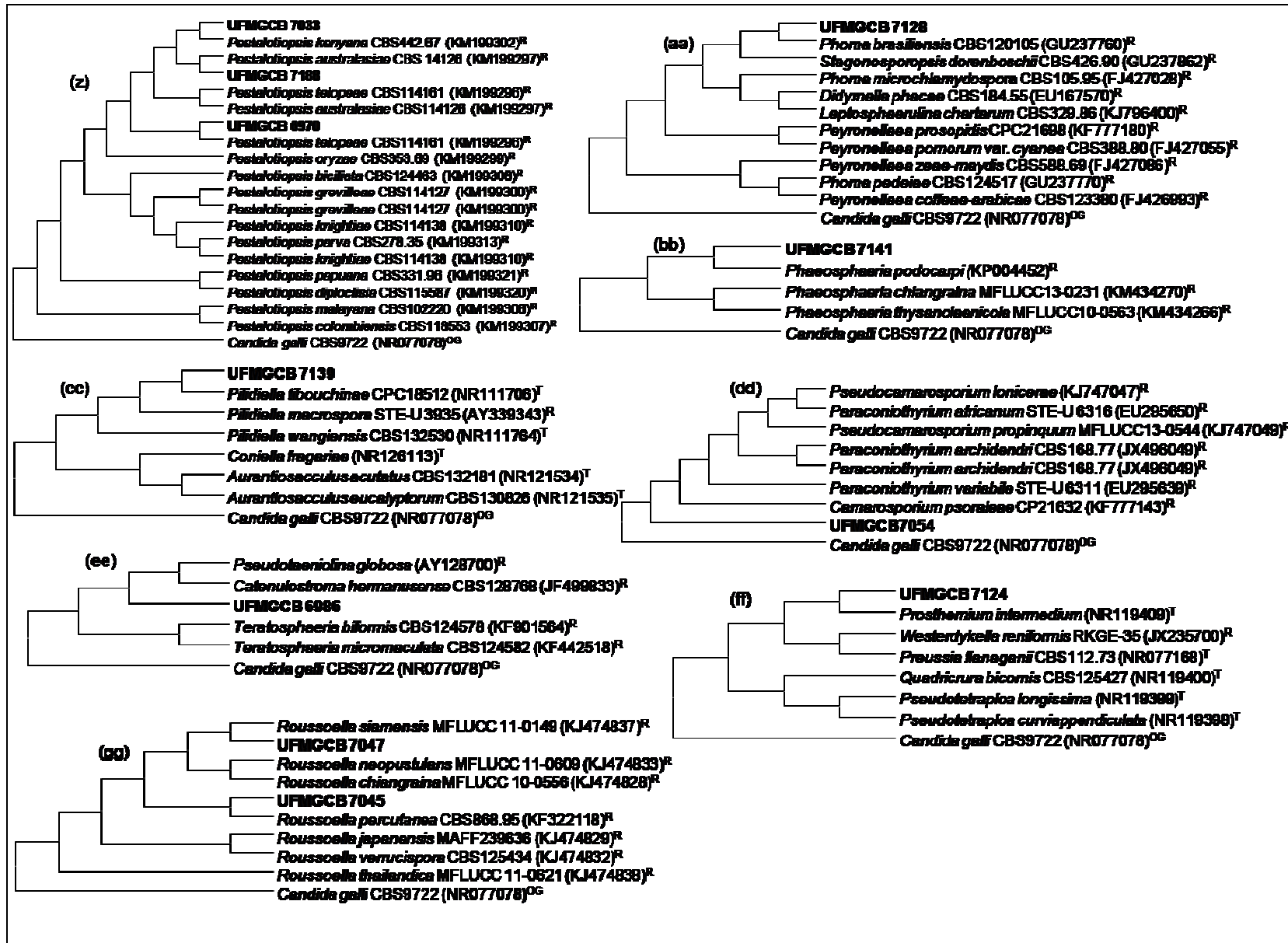
<sup>a</sup>UFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Táxon sujeito a análise filogenética baseada no sequenciamento da região <sup>b</sup>ITS, <sup>c</sup> $\beta$ -tubulina, <sup>d</sup>Polimerase II e <sup>e</sup>D1/D2do RNA ribossomal. <sup>f</sup>Posição taxonômica sugerida.



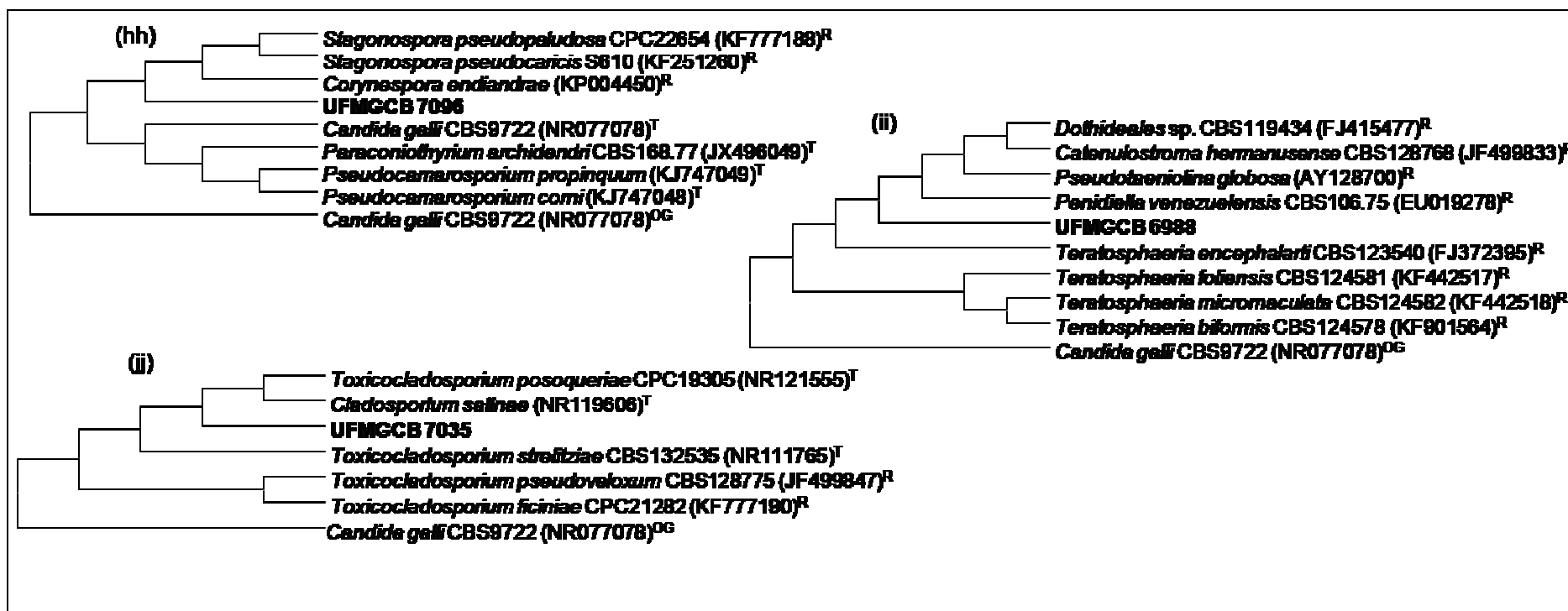




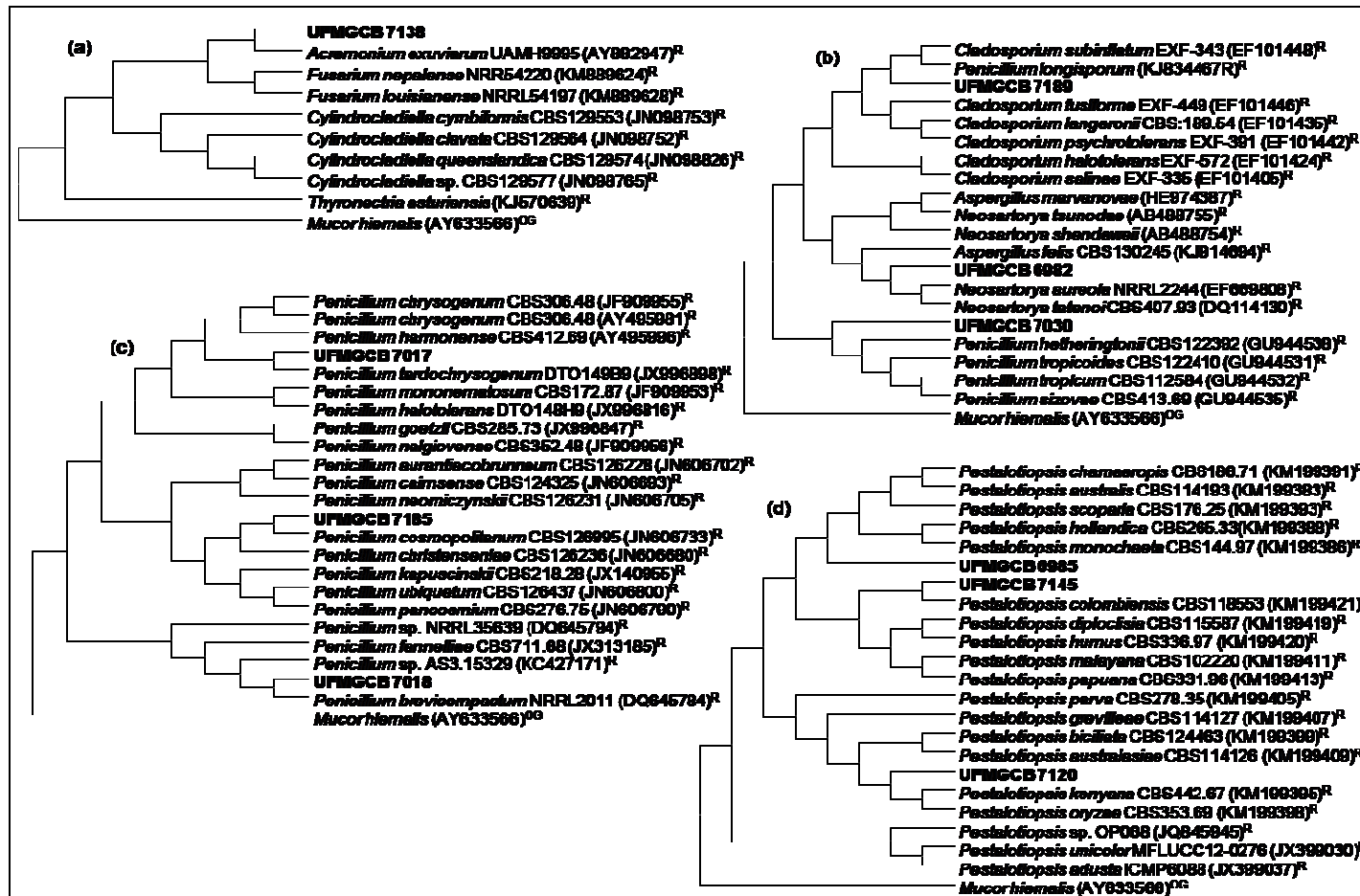




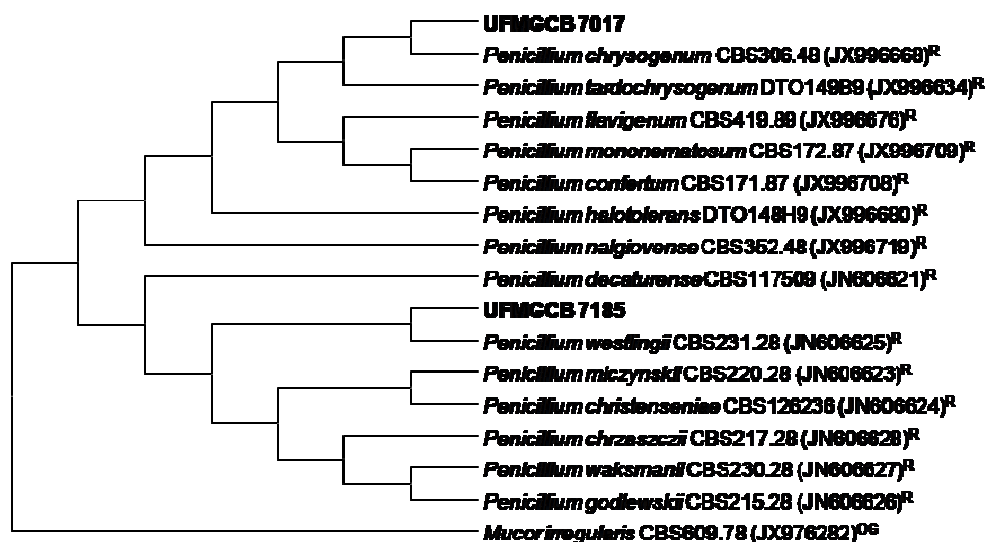




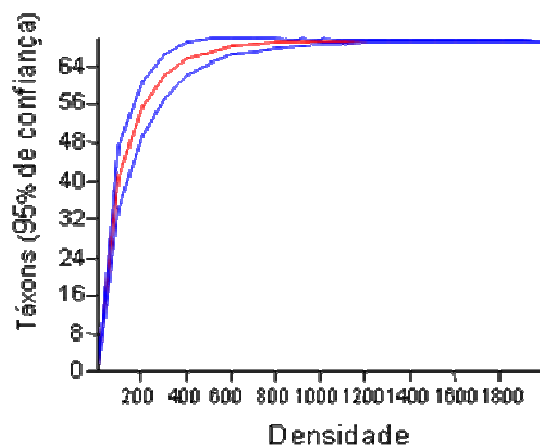
**Figura 4:** Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) obtidos de rochas de Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo utilizado. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.



**Figura 5:** Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) obtidos de rochas de Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo utilizado. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da  $\beta$ -tubulina, por meio do parâmetro Composto Máximo de Likelihood



**Figura 6:** Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) obtidos de rochas de Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo utilizado. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da RPB II, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.



**Figura 7:** Curva de rarefação de táxons (Índice de Mao-Tou) dos fungos obtidos de rochas do Campo de Altitude da RPPN Santuário do Caraça, construída com intervalo de 95% de confiança.

### 5.1.3 Atividade biológica e identificação de metabólitos bioativos

Foram produzidos 255 extratos a partir dos fungos filamentosos e das 37 leveduras. Todos os extratos etanólicos produzidos foram armazenados a 100 mg/mL. Soluções de 250 µg/mL foram preparadas e testadas contra os micro-organismos alvos. Ao final da triagem, nove extratos (3%) apresentaram inibição  $\geq 70\%$  contra pelo menos um dos micro-organismos alvos e foram considerados ativos. Destes, sete apresentaram atividade contra *E. coli* com inibição entre 84 e 100%. Dois extratos mostraram inibição de 98% contra *S. aureus*, um extrato inibiu 71% a levedura *C. krusei* e outro 94% o fungo *C. sphaerospermum*.

Todos os extratos ativos foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) a partir de concentrações que variaram de 250 a 0,488 µg/mL (Tabela 2). Após a repetição do ensaio, seis extratos (1,9%) confirmaram atividade contra *E. coli* e a menor CIM encontrada para este alvo foi 125 µg/mL. O extrato do fungo *Didymosphaeriaceae* sp. UFMGCB 7173 também permaneceu ativo contra *S. aureus* e apresentou CIM de 250 µg/mL. O extrato do fungo *Acremonium* sp. UFMGCB 7138 apresentou atividade antifúngica seletiva contra *C. sphaerospermum* com CIM de 62,5

µg/mL. Nenhum extrato foi ativo frente às leveduras *C. albicans* e *C. krusei* e a bactéria *P. aeruginosa*.

Os fungos utilizados para obtenção dos extratos etanólicos ativos foram re-cultivados para produção de novos extratos utilizando o solvente DCM, os quais foram secos, solubilizados e armazenados a 100 mg/mL. Após ser testados novamente, apenas o extrato diclorometânico do fungo *Acremonium* sp. UFMGCB 7138 manteve a atividade contra o fungo *C. sphaerospermum* com CIM de 125 µg/mL. Dessa forma, este extrato foi submetido à análise química preliminar por meio da técnica de RMN H<sup>1</sup> (Anexo a). Esta análise indicou a presença predominante de ácidos graxos no extrato, o qual foi analisado por meio da CG-FID e os ácidos graxos, linoléico (75,88%), palmítico (12,3%), oléico (5,17%), esteárico (3,25%), pentadecanóico (2,0%), heptadecanóico (1,4%) foram identificados e quantificados.

**Tabela 2:** Atividade dos extratos etanólicos (250 µg/mL) obtidos a partir dos fungos isolados de rochas do Campo de Altitude na RPPN Santuário do Caraça, sobre inibição do crescimento dos microrganismos.

Espécie de fungo	UFMGCB <sup>a</sup>	Inibição do crescimento dos microrganismos (%)					
		Fungos			Bactérias		
		<i>C. albicans</i> <sup>b</sup>	<i>C. krusei</i> <sup>f</sup>	<i>C. shaerospermum</i> <sup>d</sup>	<i>E. coli</i> <sup>e</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>f</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>g</sup>
<i>Cladophialophora</i> sp.	7037	24 ± 0	41 ± 26	0 ± 18	<b>84 ± 0</b> (250)	26 ± 4	7 ± 17
<i>Acremonium</i> sp.	7138	38 ± 1	62 ± 2	<b>94 ± 17</b> (62,5/ 125 <sup>h</sup> )	0 ± 6	0 ± 13	0 ± 11
<i>Didymosphaeriaceae</i> sp.	7173	48 ± 0	4 ± 0	13 ± 11	<b>100 ± 9</b> (250)	<b>98 ± 2</b> (250)	1 ± 7
<i>Pestalotiopsis australasiae</i>	7188	44 ± 1	61 ± 4	0 ± 88	<b>99 ± 547</b> (250)	85 ± 28	0 ± 13
<i>Cladosporium</i> cf. <i>pini-ponderosae</i>	7189	32 ± 2	60 ± 3	0 ± 22	<b>100 ± 15</b> (125)	87 ± 60	8 ± 1
<i>Pezizomycotina</i> sp.	7190	35 ± 0	52 ± 1	3 ± 42	<b>100 ± 10</b> (250)	70 ± 0	0 ± 10
Controles	Anfo B <sup>i</sup>	<b>100 ± 23</b>	<b>100 ± 13</b>	-	-	-	-
	Benomil	-	-	<b>95 ± 10</b>	-	-	-
	Clo <sup>j</sup>	-	-	-	<b>100 ± 5</b>	<b>98 ± 12</b>	<b>83 ± 6</b>

<sup>a</sup>UFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>b</sup>*Candida albicans* ATCC18804; <sup>c</sup>*Candida krusei* ATCC6258; <sup>d</sup>*Cladosporium shaerospermum* CCT1740; <sup>e</sup>*Escherichiacoli* ATCC11775; <sup>f</sup>*Staphylococcus aureus*

ATCC12600; <sup>g</sup>*Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145; <sup>h</sup>Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) após re-cultivo do fungo *Acremonium* sp. UFMGCB 7138 e extração com diclorometano (DCM). <sup>i</sup>Anfo B = anfotericina; <sup>j</sup>Clo = cloranfenicol. Concentrações: extratos fúngicos: 250 µg/mL; anfotericina B testada a 2 µg/mL; cloranfenicol a 32 µg/mL; benomil a 1,16 µg/mL. Em negrito o percentual de inibição dos extratos ativos com o coeficiente de variação e valor da CIM mostrado entre parênteses em µg/mL.

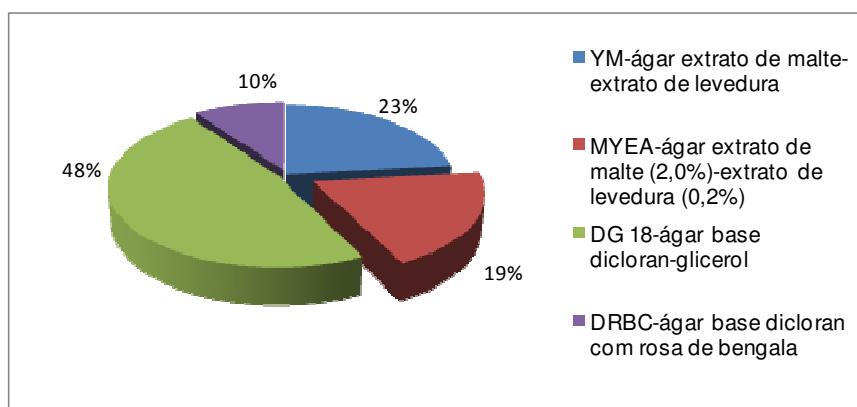
## 5.2 Fungos habitantes de rochas do Deserto do Atacama, Chile

### 5.2.1 Amostragem e Isolamento dos fungos

A partir da coleta (Tabela 3) realizada no Deserto do Atacama no Chile foram obtidos 81 isolados de fungos filamentosos. Não houve crescimento de leveduras. Houve crescimento fúngico em todos os meios de cultura utilizados (Figura 8) e a maior proporção obtida foi com o meio DG18 (48%). No meio YM cresceram 23% dos isolados, enquanto apenas 10% foram obtidos do meio DRBC.

**Tabela 3:** Número de amostras coletadas em cada local estudado do Deserto do Atacama e suas respectivas altitudes.

Local de coleta	Código da amostra de rocha	Altitude (m)
Deserto do Atacama, Chile	7, 8 e 9	5.047
	4, 5 e 6	4.519
	16, 17 e 18	4.342
	10, 11 e 12	3.981
	1, 2 e 3	3.570
	13, 14 e 15	3.003
	19, 20 e 21	2.602
	22, 23 e 24	746

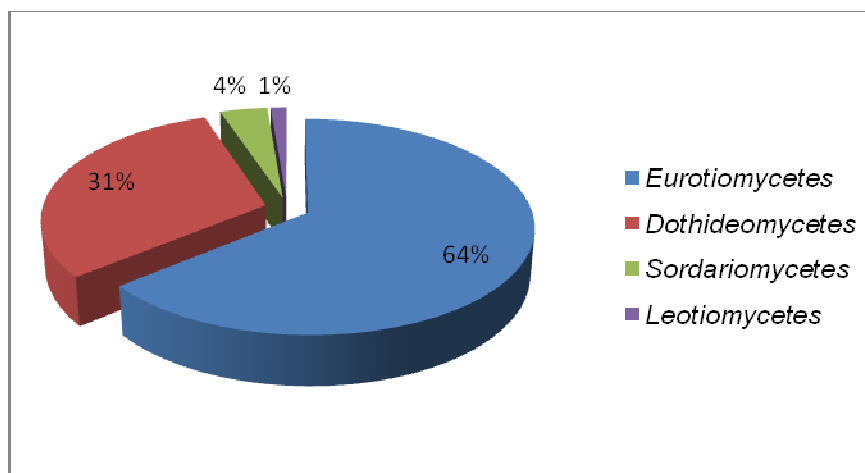


**Figura 8:** Proporção (%) de isolados fúngicos obtidos nos diferentes meios de cultura utilizados no processamento das amostras de rochas coletadas no Deserto do Atacama, Chile.

### 5.2.2 Identificação e análise da diversidade dos fungos



Os 81 isolados fúngicos foram agrupados em 59 morfotipos distintos, os quais foram caracterizados como pertencentes a 12 gêneros distribuídos dentro de quatro classes do filo *Ascomycota* (Figura 9). Estes fungos foram identificados em 2 táxons (Tabela 4, Figuras 10, 11 e 12). A classe com o maior número de isolados foi *Eurotiomycetes*, representada pelos gêneros *Aspergillus*, *Eupenicillium*, *Neosartorya* e *Penicillium*; seguida por *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes* e *Leotiomycetes*. Para três isolados, UFMGCB 8016, 8022 e 8088 as técnicas moleculares utilizadas não foram suficientes para identificação.



**Figura 9:** Distribuição (%) dos isolados obtidos em nível de classe a partir de rochas do Deserto do Atacama.

A maior parte dos isolados identificados são táxons do gênero *Penicillium* (25%), seguido dos gêneros *Cladosporium* (18,7%), *Neosartorya* (17,5%) e *Aspergillus* (16,2%). Os táxons minoritários (representados por apenas um isolado) foram identificados como *Ascomycota* sp., *Aspergillus persii*, *Aspergillus* sp., *A. sydowii*, *A. westerdijkiae*, *Cladosporium* cf. *cladosporioides*, *C. cf. oxyporum*, *Cochliobolus* cf. *lunatus*, *Devriesia* sp., *Didymellaceae* sp., *Hypoxyton* cf. *trugodes*, *Macroventuria* cf. *anomachaeta*, *Penicillium* cf. *pulvillorum* e *Pseudogymnoascus* cf. *pannorum*; os quais representaram 17,7% (14) do total de isolados obtidos. A densidade dos táxons variou de 100 a >300 UFC/g. *Cladosporium halotolerans*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium* cf. *citrinum* foram os táxons mais frequentes e abundantes, os quais ocorreram em pelo menos quatro altitudes diferentes e apresentaram os maiores valores de UFC/g (Tabela 5). Na altitude de 4.342 m apenas um isolado foi obtido, UFMGCB 8082 apresentou contagem de 100 UFC/g e foi identificado como *Pseudogymnoascus* cf. *pannorum*.

A diversidade, riqueza e dominância das comunidades fúngicas variou ao longo do gradiente de altitude. Os índices de diversidade (Fisher's  $\alpha$ ), riqueza (Margalef's) e dominância (Simpson's) apresentaram valores considerados medianos (Tabela 6) quando

comparados com comunidades de fungos de outros ambientes. Os maiores valores de diversidade, riqueza e dominância ocorreram entre as altitudes de 3.003 a 3.981 m, com valores máximos a 3.570 m, onde foi encontrado o maior número de táxons (15), quando comparada com as outras altitudes. Por outro lado, os valores mais baixos foram encontrados na altitude de 4.342 m. Ao considerar os valores obtidos para a comunidade de fungos isolados de rochas do Deserto do Atacama, sem considerar as diferentes altitudes amostradas, os índices de riqueza e diversidade foram mais altos. Da mesma forma, o índice de dominância foi próximo de 1, indicando uma alta diversidade e menor dominância. Já o esforço amostral da comunidade de fungos de rochas do Deserto do Atacama, demonstrado pela curva de rarefação construída (Figura 13), indicou que a diversidade total (riqueza e composição de espécies) foi obtida, pois foi possível observar a presença da assíntota no gráfico.

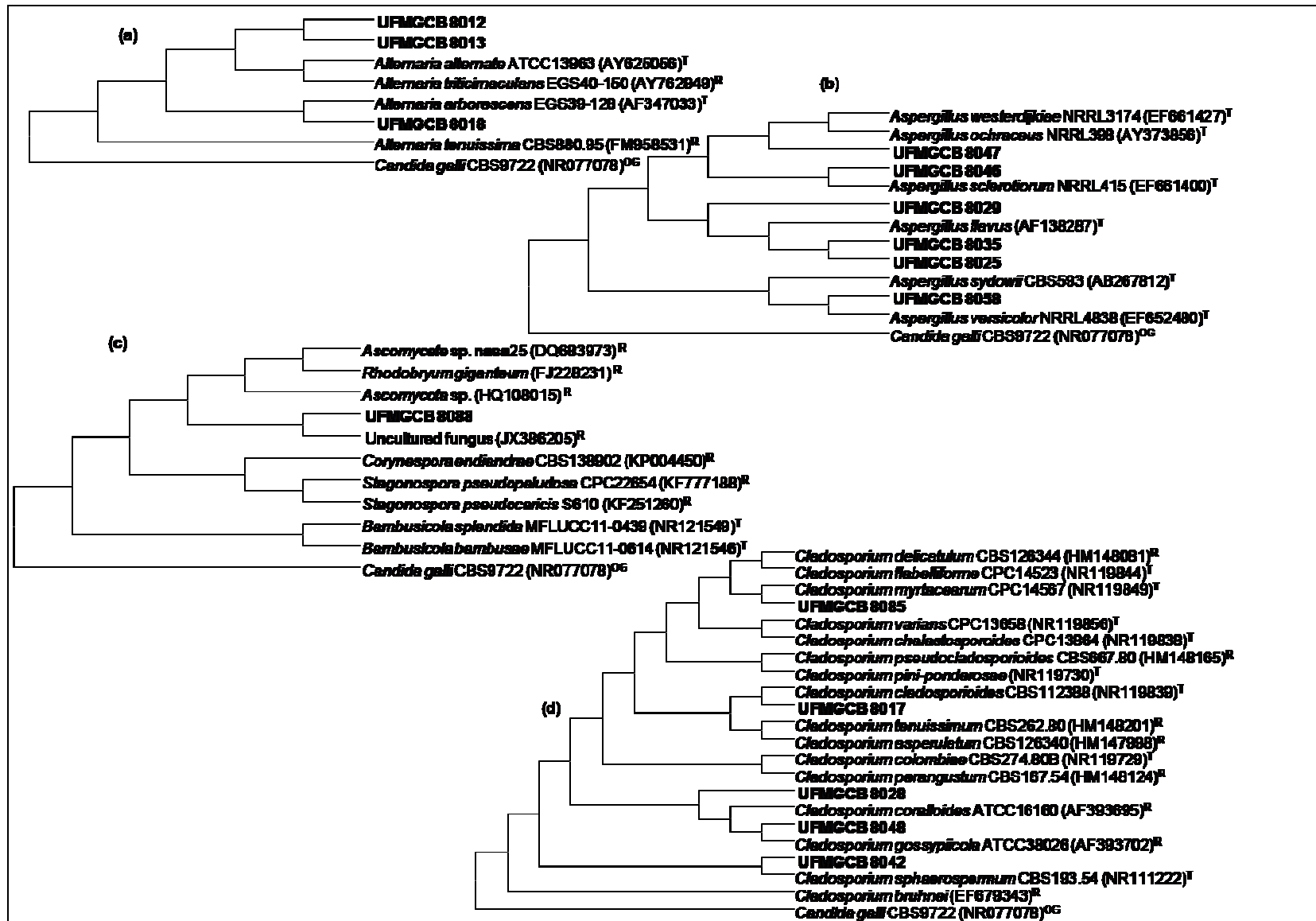
**Tabela 4:** Identificação molecular dos fungos obtidos de rochas do Deserto do Atacama.

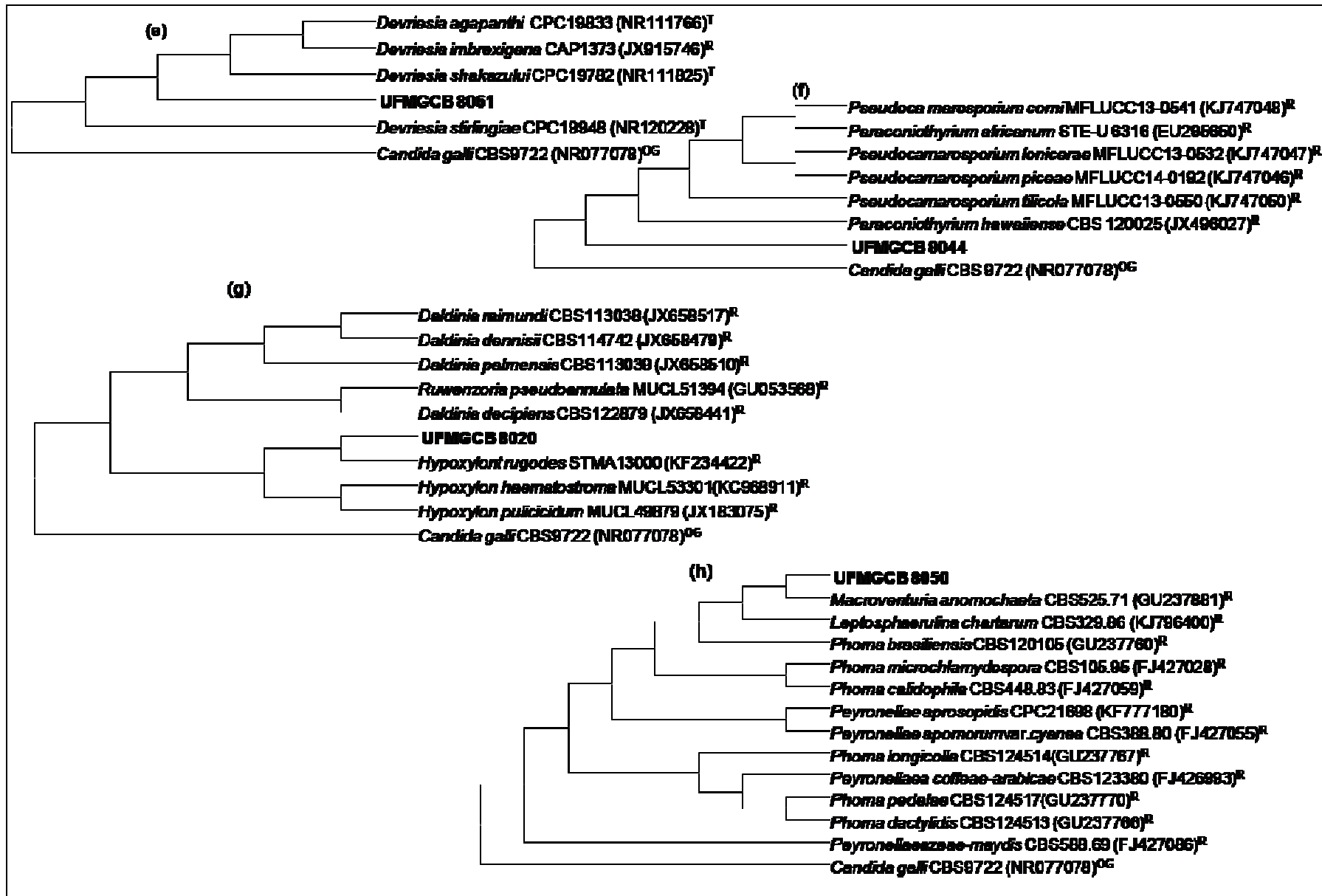
Código do UFMGCB <sup>a</sup>	Resultado Top BLAST [n° de acesso do GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto <sup>e</sup> [n° acesso no Genbank]
8018 <sup>b</sup>	<i>Alternaria alternata</i> [KJ605840]	100	100	462	<i>Alternaria</i> cf. <i>arborescens</i> [KP973595 <sup>f</sup> ]
8012 <sup>b</sup>	<i>Alternaria arborescens</i> [KJ609138]	100	100	484	<i>Alternaria</i> sp.1 [KP973594 <sup>f</sup> ]
8013 <sup>b</sup>	<i>Alternaria alternata</i> [KF051239]	100	99	488	<i>Alternaria</i> sp.2 [KP973596 <sup>f</sup> ]
8088 <sup>b</sup>	Uncultured fungus [GU054203]	100	97	587	<i>Ascomycota</i> sp. [KP973597 <sup>f</sup> ]
8025 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus felis</i> [KF558318]	100	99	546	<i>Aspergillus felis</i> [KP973603 <sup>f</sup> ]
8035 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus</i> aff. <i>fumigates</i> [JN246062]	99	100	594	<i>Aspergillus lentulus</i> [KP973598 <sup>f</sup> ]
8046 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> [AY373866]	100	99	498	<i>Aspergillus persii</i> [KP973599 <sup>f</sup> ]
8029 <sup>b</sup>	<i>Aspergillus cristatus</i> [KF923732]	99	98	505	<i>Aspergillus</i> sp. [KP973602 <sup>f</sup> ]
8058 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus sydowii</i> [AY373869]	100	99	516	<i>Aspergillus sydowii</i> [KP973600 <sup>f</sup> ]
8047 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> [FM986325]	100	98	536	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> [KP973601 <sup>f</sup> ]
8017 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium bruhnei</i> [KC461496]	100	99	473	<i>Cladosporium</i> cf. <i>cladosporioides</i> [KP973605 <sup>f</sup> ]
8048 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [JN033465]	99	99	500	<i>Cladosporium</i> cf. <i>gossypicola</i> [KP973607 <sup>f</sup> ]

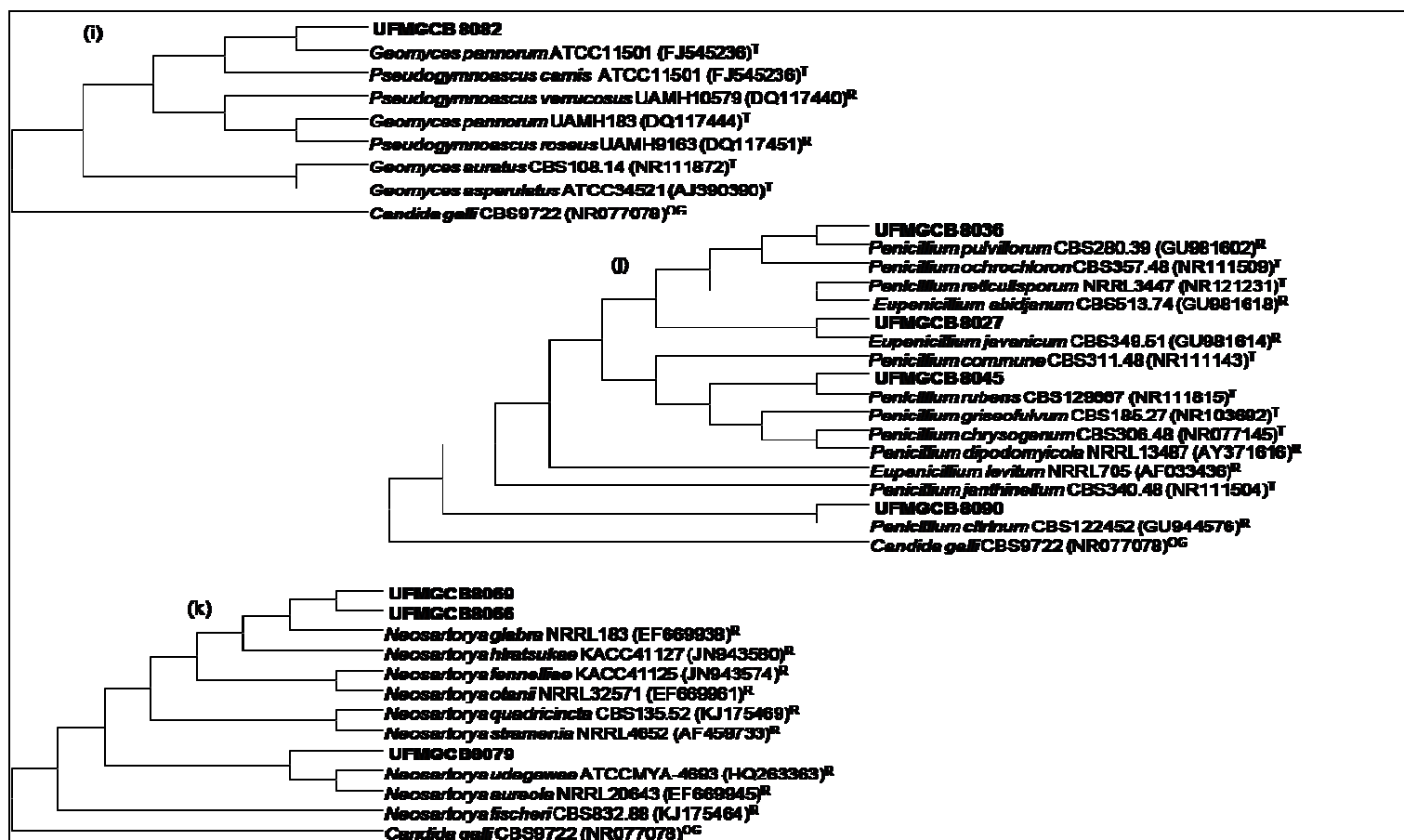
8085 <sup>b</sup>	<i>Cladosporium flabelliforme</i> [KJ439170]	100	99	483	<i>Cladosporium</i> cf. <i>myrtacearum</i> [KP973606 <sup>f</sup> ]
8028 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [KJ598781]	100	99	493	<i>Cladosporium oxysporum</i> [KP973608 <sup>f</sup> ]
8042 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [KJ658295]	100	99	443	<i>Cladosporium halotolerans</i> [KP973604 <sup>f</sup> ]
8072	<i>Cochliobolus lunatus</i> [JQ885447]	100	99	522	<i>Cochliobolus lunatus</i> [KP973609 <sup>f</sup> ]
8061 <sup>b</sup>	<i>Devriesia xanthorrhoeae</i> [HQ599605]	100	92	570	<i>Devriesia</i> sp. [KP973610 <sup>f</sup> ]
8044 <sup>b</sup>	<i>Didymellaceae</i> sp. [KC871035]	100	99	527	<i>Didymellaceae</i> sp. [KP973611 <sup>f</sup> ]
8027 <sup>b,c</sup>	<i>Eupenicillium javanicum</i> [KF313084]	100	99	561	<i>Eupenicillium javanicum</i> [KP973612 <sup>f</sup> ]
8023	<i>Fusarium oxysporum</i> [GU205817]	100	100	484	<i>Fusarium oxysporum</i> [KP973613 <sup>f</sup> ]
8020 <sup>b</sup>	<i>Hypoxylon</i> sp. [HM752513]	98	97	502	<i>Hypoxylon</i> cf. <i>trugodes</i> [KP973615 <sup>f</sup> ]
8050 <sup>b</sup>	<i>Phoma multirostrata</i> [KJ767077]	100	99	424	<i>Macroventuria</i> cf. <i>anomachaeta</i> [KP973622 <sup>f</sup> ]
8079 <sup>b,c</sup>	<i>Neosartorya udagawae</i> [HQ263363]	100	100	582	<i>Neosartorya</i> cf. <i>udagawae</i> [KP973616 <sup>f</sup> ]
8066 <sup>b,c</sup>	<i>Neosartorya glabra</i> [EF669938]	100	99	502	<i>Neosartorya</i> sp. 1 [KP973617 <sup>f</sup> ]
8069 <sup>b,c</sup>	<i>Neosartorya hiratsukae</i> [FR837959]	100	99	523	<i>Neosartorya</i> sp. 2 [KP973618 <sup>f</sup> ]
8090 <sup>b,c,d</sup>	<i>Penicillium citrinum</i> [KJ606689]	100	100	609	<i>Penicillium</i> cf. <i>citrinum</i> [KP973620 <sup>f</sup> ]

8036 <sup>b,c</sup>	<i>Penicillium ochrochloron</i> [KF358720]	100	99	663	<i>Penicillium</i> cf. <i>pulvillorum</i> [KP973621 <sup>f</sup> ]
8045 <sup>b,c,d</sup>	<i>Penicillium chrysogenum</i> [KJ413370]	100	100	627	<i>Penicillium chrysogenum</i> [KP973619 <sup>f</sup> ]
8082 <sup>b</sup>	<i>Geomyces pannorum</i> [HQ115661]	100	99	638	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>pannorum</i> [KP973614 <sup>f</sup> ]

<sup>a</sup>UFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Táxon sujeito a análise filogenética baseada no sequenciamento da região <sup>b</sup>ITS, <sup>c</sup> $\beta$ -tubulina e <sup>d</sup>Polimerase II. <sup>e</sup>Posição taxonômica sugerida. <sup>f</sup>Sequências de ITS depositadas no Genbank.

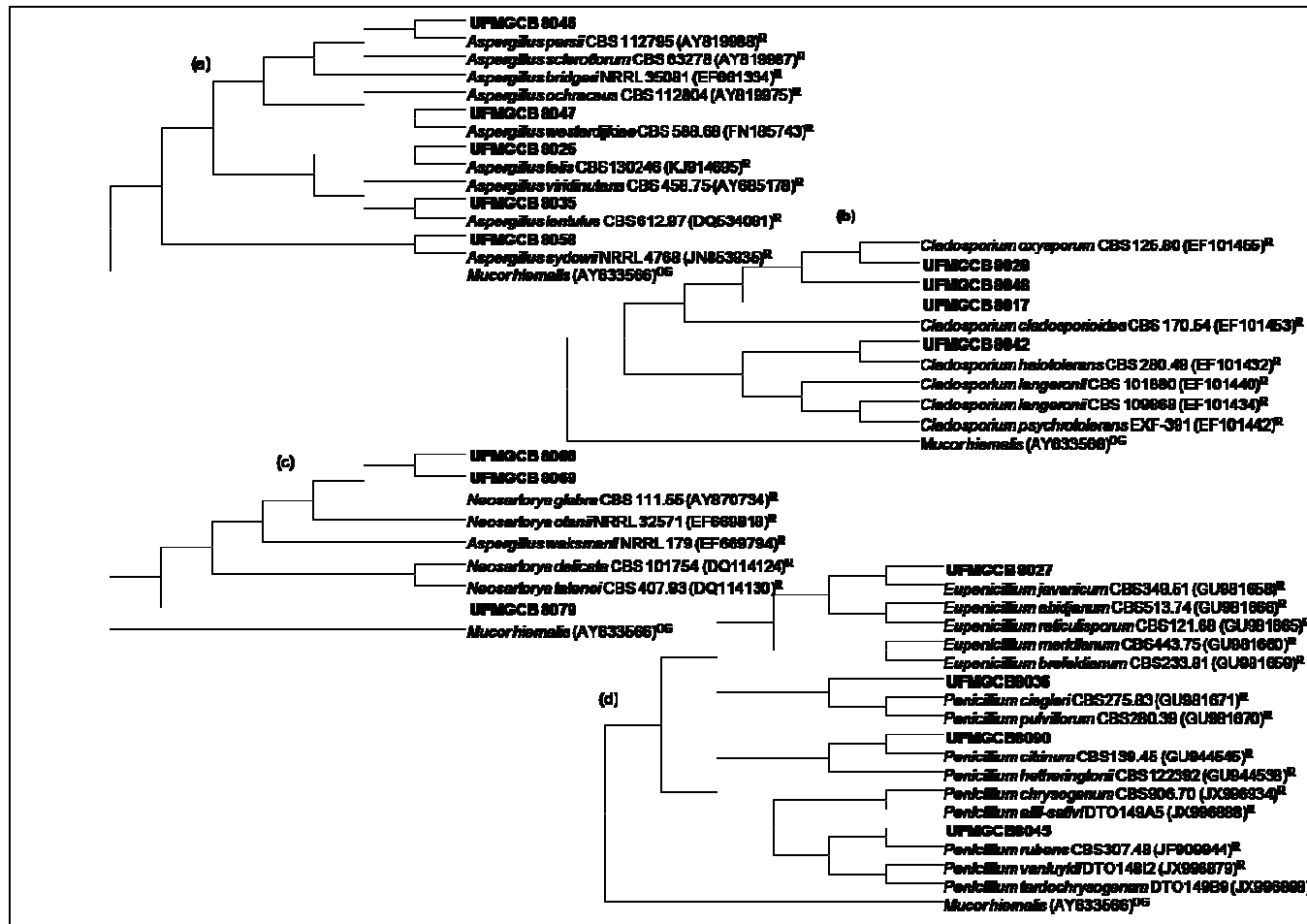




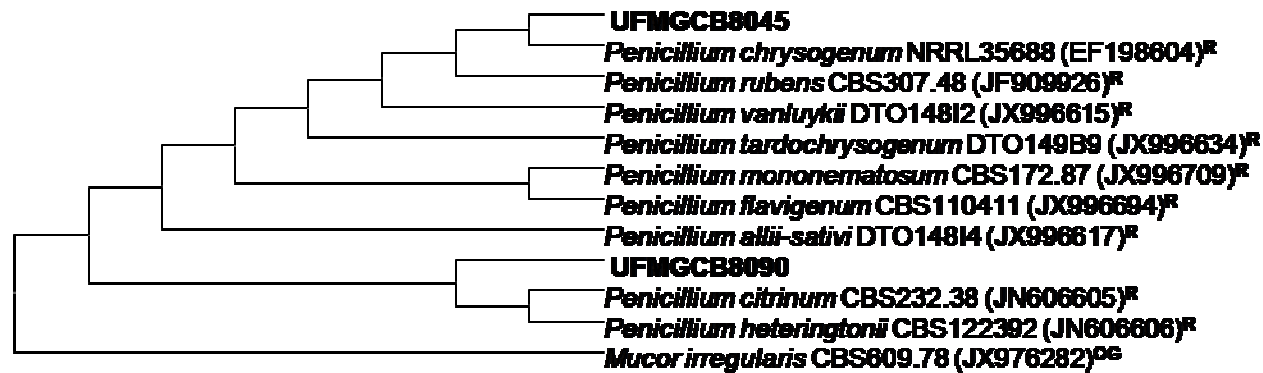


**Figura 10:** Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) presentes no Deserto do Atacama em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.





**Figura 11:** Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes no Deserto do Atacama em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da  $\beta$ -tubulina, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.



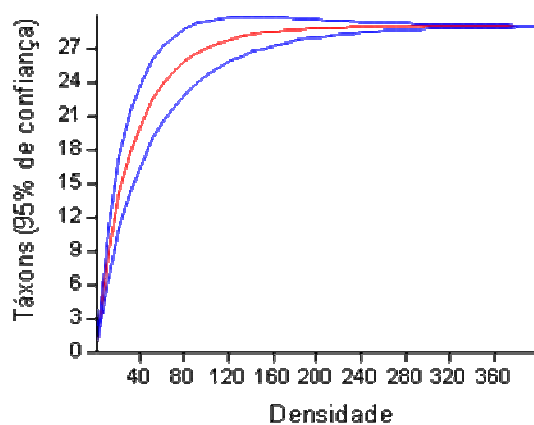
**Figura 12:** Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) presentes no Deserto do Atacama em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da RPB II, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.

**Tabela 5:** Táxons obtidos de rochas do Deserto do Atacama distribuídos de acordo com a altitude dos locais de coleta e suas respectivas densidades (UFC/g).

Táxons fúngicos	Altitude em metros (a.n.m)							
	746	2.602	3.003	3.570	3.981	4.342	4.519	5.047
<i>Alternaria</i> cf. <i>arborescens</i>	-	<b>100<sup>a</sup></b>	-	<b>200</b>	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp. 1	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp. 2	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-
Ascomycota sp.	<b>100</b>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus felis</i>	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-
<i>Aspergillus lentulus</i>	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-
<i>Aspergillus persii</i>	-	-	-	-	-	-	<b>100</b>	-
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	<b>200</b>	-	-	-	-
<i>Aspergillus sydowii</i>	-	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-
<i>Aspergillus westerdijikiae</i>	-	-	-	-	-	-	<b>100</b>	-
<i>Cladosporium</i> cf. <i>cladosporioides</i>	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> cf. <i>gossypiicola</i>	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-	<b>100</b>
<i>Cladosporium</i> cf. <i>myrtacearum</i>	-	<b>&gt;300</b>	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> cf. <i>oxysporum</i>	-	-	-	<b>300</b>	-	-	-	-
<i>Cladosporium halotolerans</i>	<b>100</b>	-	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>150</b>	-	<b>100</b>	-
<i>Cochliobolus lunatus</i>	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-	-
<i>Devriesia</i> sp.	-	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-
<i>Didymellaceae</i> sp.	-	-	-	-	-	-	<b>100</b>	-
<i>Eupenicillium javanicum</i> .	-	-	-	<b>133.3</b>	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	<b>150</b>	-	-	-	-
<i>Hypoxyton</i> cf. <i>trugodes</i>	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-
<i>Macroventuria</i> cf. <i>anomachaeta</i>	-	-	-	-	-	-	-	<b>100</b>
<i>Neosartorya</i> cf. <i>udagawae</i>	-	-	<b>100</b>	<b>100</b>	-	-	-	-

<i>Neosartorya</i> sp. 1	-	-	-	-	<b>300</b>	-	-	-
<i>Neosartorya</i> sp. 2	-	-	-	<b>200</b>	<b>283</b>	-	-	-
<i>Penicillium</i> cf. <i>citrinum</i>	<b>100</b>	-	<b>100</b>	-	<b>&gt;300</b>	-	-	<b>300</b>
<i>Penicillium</i> cf. <i>pulvillorum</i>	-	-	-	<b>100</b>	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	-	-	<b>100</b>	-	<b>100</b>	-	<b>&gt;300</b>	<b>300</b>
<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>pannorum</i>	-	-	-	-	-	<b>100</b>	-	-

<sup>a</sup>Densidade em unidades formadoras de colônias (UFC). - = ausência. a.n.m. = acima do nível do mar.



- 5 **Figura 13:** Curva de rarefação de táxons (Índice de Mao-Tou) dos fungos obtidos de rochas do Deserto do Atacama, construída com intervalo de 95% de confiança.

**Tabela 6:** Índices de diversidade das comunidades de fungos presentes nas rochas do Deserto do Atacama em diferentes altitudes.

Índices de diversidade	Altitude em metros (a.n.m.)								
	746	2.602	3.003	3.570	3.981	4.342	4.519	5.047	Geral
Simpson's	0,67	0,44	0,83	0,92	0,83	0	0,73	0,69	0,96
Margalef's	0,35	0,18	0,78	1,81	0,84	0	0,61	0,45	3,34
Fisher's $\alpha$	0,46	0,29	0,93	2,15	0,98	0,15	0,73	0,55	4,17

a.n.m. = acima do nível do mar.

### 5.2.3 Atividade biológica, purificação e identificação de metabólitos bioativos

Oitenta e um extratos foram preparados e testados contra os micro-organismos alvos. Ao final da triagem, 28,3% (23) dos extratos apresentaram inibição  $\geq 70\%$  e foram considerados ativos contra pelo menos um dos micro-organismos alvos avaliados (Tabela 7). Dentre os gêneros que apresentaram extratos bioativos estão espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hypoxylon*, *Neosartorya* e *Penicillium*. Os extratos de *Alternaria* cf. *arborescens* UFMGCB 8018 e *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 apresentaram atividade frente a *S. aureus* e *C. albicans*. Vinte extratos apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem de célula tumoral humana MCF-7, incluindo o extrato de *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 (com 80% de inibição). Os extratos de *Aspergillus felis* UFMGCB 8011, 8019 e 8025 apresentaram atividade acima de 90% contra MCF-7. Cinco extratos de *F. oxysporum*, um *Hypoxylon* cf. *trugodes* e um *P. chrysogenum* foram capazes de inibir formas amastigotas de *T. cruzi*, com valores iguais ou próximos ao da droga controle (benzonidazol). Já o extrato *Hypoxylon* cf. *trugodes* UFMGCB 8020 obtido de rochas coletadas a 3.570 m.a.m mostrou uma forte e seletiva inibição antiviral contra o vírus Dengue, com uma concentração efetiva a 50 ( $CE_{50}$ ) de 1,18  $\mu\text{g/mL}$ .

Os extratos com atividade antimicrobiana foram submetidos à caracterização química preliminar pela RMN  $^1\text{H}$  (Anexo b) para investigação da presença de metabólitos secundários com interesse químico. A análise do extrato de *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 mostrou a presença de ácidos graxos, mas também substâncias aromáticas. Além disso, este extrato foi o único que manteve atividade após re-cultivo para cálculo do CIM (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Dessa forma, foi selecionado para o fracionamento biomonitorado. O isolado *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 foi re-cultivado em larga escala em aproximadamente 500 placas de Petri contendo o meio de cultura YM.

Inicialmente, 1,312 g de extrato de *P. chrysogenum* UFMGCB 8074, após o re-cultivo, foram utilizados para o fracionamento biomonitorado (Figura 14). O extrato foi adsorvido em sílica gel para cromatografia (40-63  $\mu\text{m}$ , 40 x 150 mm, 60 Å). Para eluição foi utilizado um mistura de solventes com gradiente crescente de polaridade de hexano/acetato de etila de acordo com os seguintes passos: 1) 100:0 até 396 mL, 2) 100:0 a 40:60 usando 2100 mL, e 3) 40:60 a 0:100 usando 600 mL. O eluente da coluna foi coletado em tubos de vidro de 27 mL e, baseado na similaridade dos perfis de CCD, agrupados em 12 frações [(1), 1-17, 37,7 mg; (2), 18-20, 169,6 mg; (3), 21-25, 21,3 mg; (4), 26-31, 27,2 mg; (5), 32-35, 20,0 mg; (6), 36-38, 49,3 mg; (7), 39-53, 183,4 mg; (8), 54-56, 15,1 mg; (9), 57-61, 30,3 mg; (10), 62-67, 49,4 mg; (11), 68-104, 25,6 mg; e (12) 105-117, 1.124,6 mg]. As frações 8 e 9 foram selecionadas para dar continuidade ao fracionamento já que apresentaram atividade

antibacteriana e antifúngica contra os micro-organismos *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans*, *S. aureus*, MRS, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Posteriormente, análises dos perfis de CCD e resultados de RMN  $^1\text{H}$ , revelaram o mesmo perfil químico para ambas as frações. Dessa forma, as frações 8 e 9 foram combinadas e 39,6 mg da fração resultante foi adsorvida em coluna de sílica gel para cromatografia. A eluição foi realizada com um gradiente crescente de polaridade de hexano/acetato de etila em quatro passos: 1) 100:0 até 396 mL, 2) 100:0 a 70:30 usando 2200 mL, 3) 70:30 a 50:50 usando 600 mL e 4) 50:50 a 0:100 até 400 mL. O volume eluído também foi coletado em tubos de vidro de 27 mL, que de acordo com a similaridade dos perfis de CCD, resultaram em 6 frações [(A), 1-84, 6,1 mg; (B), 85-91, 2,4 mg; (C), 92-95, 4,0 mg; (D), 96-99, 14,7 mg; (E), 100-103, 7,3 mg; (F), 104-132, 7,4 mg]. A fração E apresentou atividade antibacteriana e antifúngica contra *S. aureus* MRS, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. neoformans*. Os dados dos perfis de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da fração E (Anexos c, d, e, f) se assemelham com os dados apresentados por Cantrell *et al.* (1999) e permitiram elucidar a estrutura da substância como ergosterol 5,8-endoperóxido. Além disso, também foi detectada a presença de dois ácidos graxos. Para identificação destes ácidos graxos foi acrescentada à fração a solução de  $\text{CH}_2\text{N}_2$  para a produção de ésteres metílicos que posteriormente foram analisados em CG-FID e identificados como linoléico e  $\alpha$ -linolínico. Dentre as substâncias identificadas o ergosterol-5,8-endoperóxido apresentou atividade ( $\text{CI}_{50} = 13,74 \mu\text{g/mL}$ ) contra *S. aureus* MRS, semelhante à fração E ( $\text{CI}_{50} = 10,23 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 8). Da mesma forma, o ácido graxo  $\alpha$ -linolínico foi ativo contra *C. neoformans* com valores de  $\text{CI}_{50}$ , CIM e CFM de 4,47, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 7:** Atividade dos extratos diclorometânicos obtidos a partir dos fungos isolados de rochas do Deserto do Atacama, sobre inibição dos alvos.

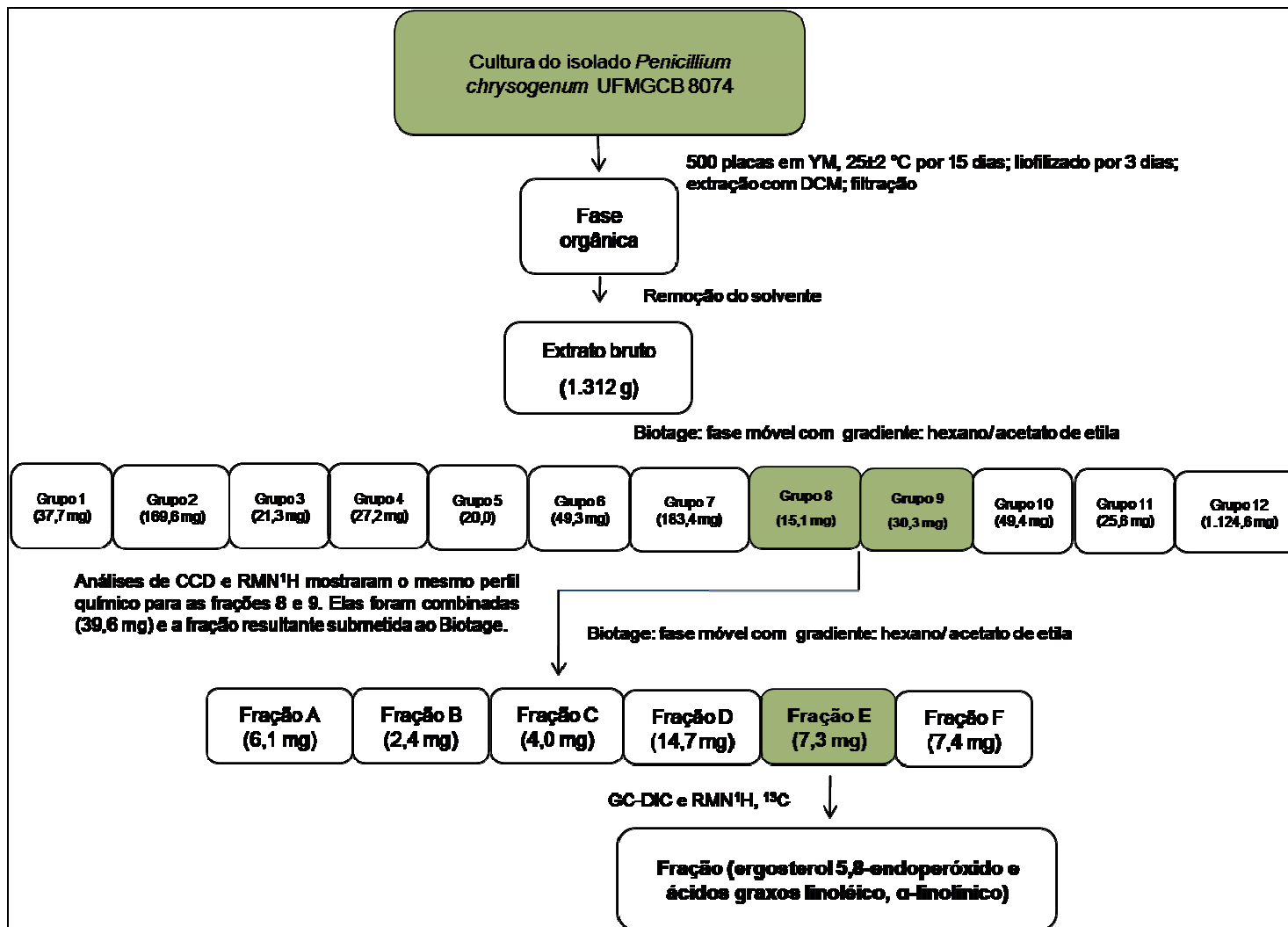
Espécies de fungos	UFMGCB <sup>a</sup>	Inibição dos alvos biológicos (%)									
		Protozoários		Célula tumoral	Fungos				Bactérias		Vírus
		<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	MCF-7	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<sup>9</sup> DENV-2
<i>Alternaria cf. arborescens</i>	8018	0 ± 1	3 ± 0	54 ± 8	17 ± 0	53 ± 1	0 ± 0	17 ± 34	<b>99 ± 19</b>	0 ± 2	na
<i>Aspergillus felis</i>	8024	0 ± 1	13 ± 0	<b>80 ± 15</b>	12 ± 0	52 ± 3	0 ± 23	0 ± 5	0 ± 13	0 ± 0	na
<i>A. felis</i>	8030	12 ± 0	0 ± 1	<b>81 ± 18</b>	0 ± 0	48 ± 1	11 ± 4	0 ± 1	0 ± 6	12 ± 0	-
<i>A. felis</i>	8040	8 ± 4	8 ± 0	<b>89 ± 5</b>	0 ± 1	39 ± 1	1 ± 18	0 ± 11	0 ± 4	22 ± 0	-
<i>A. felis</i>	8025	0 ± 4	12 ± 0	<b>92 ± 1</b>	17 ± 0	55 ± 2	0 ± 35	0 ± 5	0 ± 3	16 ± 0	na
<i>A. felis</i>	8011	0 ± 0	1 ± 0	<b>92 ± 19</b>	9 ± 0	52 ± 4	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 5	na
<i>A. felis</i>	8019	4 ± 0	1 ± 0	<b>92 ± 14</b>	16 ± 0	51 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 0	0 ± 11	na
<i>A. felis</i>	8046	0 ± 7	9 ± 0	<b>82 ± 20</b>	15 ± 0	0 ± 6	0 ± 5	0 ± 5	0 ± 2	2 ± 3	-
<i>A. persii</i>	8026	13 ± 2	0 ± 0	<b>89 ± 4</b>	0 ± 0	26 ± 3	13 ± 40	0 ± 5	0 ± 6	15 ± 0	na
<i>Fusarium oxysporum</i>	8023	0 ± 6	<b>18 ± 2</b>	<b>77 ± 4</b>	16 ± 0	37 ± 1	14 ± 18	17 ± 3	0 ± 22	10 ± 2	-
<i>F. oxysporum</i>	8033	0 ± 1	<b>30 ± 0</b>	23 ± 0	14 ± 0	16 ± 35	0 ± 26	0 ± 15	0 ± 9	0 ± 2	-
<i>Hypoxyylon cf. trugodes</i>	8020	4 ± 1	<b>25 ± 0</b>	<b>77 ± 0</b>	16 ± 1	35 ± 1	0 ± 16	0 ± 0	17 ± 1	17 ± 5	<b>50 ± 0</b>
<i>Neosartorya cf. udagawae</i>	8015	1 ± 0	0 ± 0	<b>87 ± 0</b>	0 ± 0	49 ± 1	0 ± 15	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 10	na
<i>N.cf. udagawae</i>	8021	20 ± 1	0 ± 0	<b>83 ± 12</b>	0 ± 3	50 ± 0	0 ± 5	0 ± 0	17 ± 1	0 ± 1	na



<i>N.cf. udagawae</i>	8079	0 ± 2	0 ± 0	<b>81 ± 9</b>	2 ± 0	48 ± 2	0 ± 26	0 ± 5	0 ± 0	7 ± 1	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	8043	0 ± 2	<b>28 ± 1</b>	<b>77 ± 4</b>	13 ± 30	25 ± 7	0 ± 65	10 ± 20	56 ± 9	17 ± 4	-
<i>P. chrysogenum</i>	8049	9 ± 1	8 ± 0	<b>70 ± 4</b>	0 ± 0	13 ± 2	42 ± 26	40 ± 5	0 ± 1	15 ± 0	na
<i>P. chrysogenum</i>	8053	0 ± 2	8 ± 0	<b>79 ± 0</b>	0 ± 0	13 ± 2	42 ± 26	40 ± 5	0 ± 1	15 ± 0	na
<i>P. chrysogenum</i>	8054	0 ± 2	12 ± 0	<b>71 ± 9</b>	0 ± 0	52 ± 0	0 ± 44	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 23	na
<i>P. chrysogenum</i>	8055	0 ± 3	3 ± 0	<b>74 ± 2</b>	10 ± 0	35 ± 1	22 ± 0	0 ± 5	0 ± 2	16 ± 0	na
<i>P. chrysogenum</i>	8057	0 ± 1	0 ± 0	<b>83 ± 4</b>	0 ± 0	35 ± 3	26 ± 16	0 ± 5	0 ± 24	9 ± 0	na
<i>P. chrysogenum</i>	<b>8074</b>	0 ± 3	6 ± 0	<b>80 ± 1</b>	<b>77 ± 56 (62,5)</b>	3 ± 2	43 ± 35	0 ± 3	9 ± 11	13 ± 3	na
<i>P. chrysogenum</i>	8081	0 ± 2	<b>22 ± 0</b>	12 ± 1	29 ± 1	0 ± 2	29 ± 27	0 ± 4	0 ± 2	31 ± 0	na
<b>Controles</b>	<sup>b</sup> Clo	-	-	-	-	-	-	<b>100 ± 5</b>	<b>98 ± 12</b>	<b>83 ± 6</b>	
	<sup>c</sup> Anf B	<b>82 ± 3</b>	-	<b>85 ± 3</b>	<b>100 ± 23</b>	<b>100 ± 13</b>	-	-	-	-	
	<sup>d</sup> Eto	-	-	<b>96 ± 5</b>	-	-	-	-	-	-	
	<sup>e</sup> Benz	-	<b>30 ± 7</b>	-	-	-	-	-	-	-	
	Benomil	-	-	-	-	-	<b>95 ± 10</b>	-	-	-	

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de cultura e Células da Universidade Federal de Minas Gérias; <sup>b</sup>Clo = cloranfenicol; <sup>c</sup>Anf B = anfotericina B; <sup>d</sup>Eto = etoposídeo; <sup>e</sup>Benz = benzonidazol; <sup>g</sup>DENV-2= Dengue vírus 2. Resultado da concentração efetiva de 50 (EC<sub>50</sub>) a 1,18 µg/mL do extrato contra o Dengue vírus 2; - = não testado. *E. coli* = *Escherichia coli*; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *C. albicans* = *Candida albicans*; *C. krusei* = *Candida krusei*; *C. sphaerosperum* = *Cladosporium sphaerosperum*; MCF-7 = linhagem celular de

câncer de mama humano; *T. cruzi* = *Trypanosoma cruzi* e *L. amazonensis* = *Leishmania amazonensis*; na = não ativo. Concentrações: extratos fúngicos: 250 µg/mL; anfotericina B testada a 2 µg/mL; cloranfenicol a 32 µg/mL; benomil a 1,16 µg/mL; etoposídeo a 8 µg/mL; benzonidazol a 1 µg/mL. Em negrito o percentual de inibição dos extratos ativos com o coeficiente de variação e valor da CIM mostrado entre parênteses em µg/mL.



**Figura 14:** Fluxograma ilustrando o processo de fracionamento biomonitorado das substâncias ativas produzidas por *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074. Em negrito, as frações e substâncias ativas.

**Tabela 8:** Atividade antifúngica da fração e substâncias obtidas do fungo *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074.

Amostras	Fungos alvos (valores em µg/mL)														
	<i>Candida albicans</i>			<i>Candida glabrata</i>			<i>Candida krusei</i>			<i>Aspergillus fumigatus</i>			<i>Cryptococcus neoformans</i>		
	<sup>a</sup> CI <sub>50</sub>	<sup>b</sup> CIM	<sup>c</sup> CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM
Fração E	<b>2,95</b>	<b>10</b>	>20	<b>5,65</b>	>20	>20	<b>3,17</b>	>20	>20	>20	>20	>20	<b>10,51</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Ergosterol 5,8- endoperóxido	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ácido Linoléico	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ácido α-linolínico	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	<b>4,47</b>	<b>10</b>	<b>20</b>

A fração E e as substâncias foram testados a 0,02 até 20µg/mL. <sup>a</sup>CI<sub>50</sub> = Concentração inibitória de 50%, <sup>b</sup>CIM = Concentração inibitória mínima; <sup>c</sup>CFM = Concentração fungida mínima. Em negrito os valores considerados ativos.

**Tabela 9:** Atividade antibacteriana da fração e substâncias obtidas do fungo *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074.

Amostras	Bactérias alvos (valores em µg/mL)														
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>S. aureus</i> MRS			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Mycobacterium intracelullare</i>		
	<sup>a</sup> CI <sub>50</sub>	<sup>b</sup> CIM	<sup>c</sup> CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM	CI <sub>50</sub>	CIM	CFM
Fração E	<b>8,93</b>	>20	>20	<b>10,23</b>	>20	>20	<b>5,8</b>	20	>20	<b>6,57</b>	20	20	>20	>20	>20
Ergosterol 5,8- endoperóxido	>20	>20	>20	<b>13,74</b>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ácido Linoléico	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ácido α-linolínico	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20

A fração E e as substâncias foram testados a 0,02 até 20 µg/mL. <sup>a</sup>CI<sub>50</sub> = Concentração inibitória de 50%, <sup>b</sup>CIM = Concentração inibitória mínima; <sup>c</sup>CBM = Concentração bactericida mínima. Em negrito os valores considerados ativos.

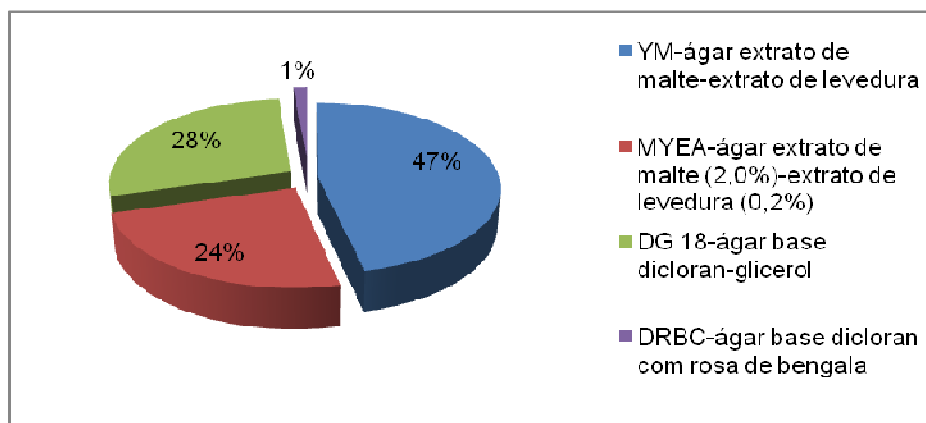
## 5.3 Fungos habitantes de rochas da Antártica continental

### 5.3.1 Coleta e Isolamento dos fungos

A coleta na região de Ellsworth na Antártica ocidental, localizada no continente antártico, foi realizada em nove pontos distintos, em altitudes que variaram de 754 a 973 m (Tabela 10). Os fragmentos foram coletados em triplicata, totalizando 27 fragmentos de rochas, os quais foram processados e plaqueados nos meios de cultura já citados. Foram obtidos 71 isolados fúngicos, 54 de fungos filamentosos e 17 leveduras. Houve crescimento de fungos em todos os meios de cultura utilizados (Figura 15). O maior número de isolados foi obtido nomeio YM (46%). O meio DG18 apresentou 28% dos isolados e o meio MYEA 25%. Assim como nas demais coletas, o meio de cultura com a menor porcentagem (1%) de crescimento foi o DRBC (com apenas um isolado).

**Tabela 10:** Número de amostras coletadas em cada local estudado da Antártica continental e suas respectivas altitudes.

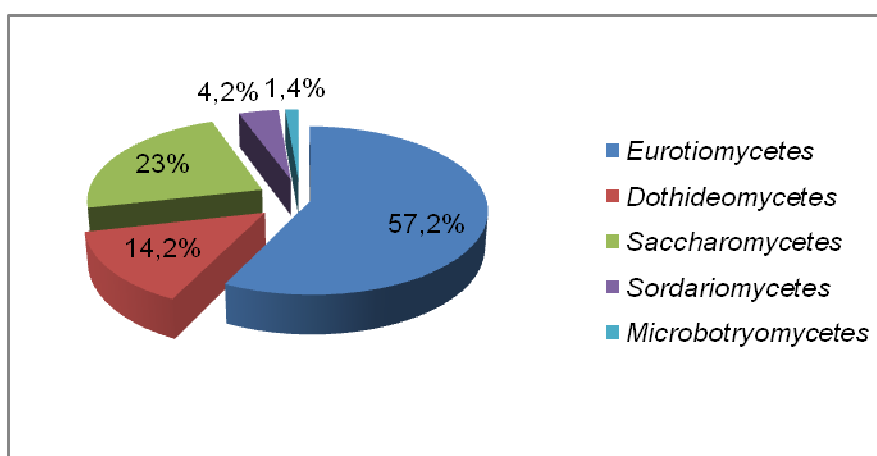
Local de coleta			Código da amostra de rocha	Altitude (m)
Montanhas continental.	Ellsworth,	Antártica	13, 14 e 15	973
			19, 20 e 21	899
			10, 11 e 12	893
			22, 23 e 24	886
			4, 5 e 6	827
			1, 2 e 3	816
			16, 17 e 18	808
			7, 8 e 9	764
			25, 26 e 27	754



**Figura 15:** Proporção (%) dos isolados fúngicos obtidos nos diferentes meios de cultura utilizados no processamento das amostras de rochas coletadas na região de Ellsworth na Antártica continental.

### 5.3.2 Identificação e análise da diversidade dos fungos

Os 71 isolados de fungos obtidos foram agrupados em 33 morfotipos distintos. Após a confirmação do agrupamento macro-morfológico, foram encontrados 40 perfis moleculares, caracterizados em seis gêneros e cinco classes (Figura 16) do filo *Ascomycota*, sendo 10 táxons diferentes (Tabela 11, Figuras 17, 18 e 19). A classe com o maior número de isolados foi *Eurotiomycetes*; seguida por *Saccharomycetes*, *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes* e *Microbotryomycetes*. Apenas o isolado UFMGCB 10031 não foi identificado.



**Figura 16:** Distribuição (%) dos isolados obtidos em nível de classe a partir de rochas da Antártica continental.

A maior parte dos isolados identificados está distribuída dentro do gênero *Penicillium* (55,7%), seguido de *Debaromyces* (23%), *Cladosporium* (14%) e *Acremonium* (4%). Os táxons minoritários foram identificados como *Rhodotorula mucilaginosa* e *Talaromyces*. A densidade de colônias fúngicas presente nas amostras de rocha variou de 100 a 250 UFC/g. *Penicillium chrysogenum*, *P. tardochrysogenum* e *C. halotolerans* foram os táxons mais abundantes, apresentando os valores 250, 185,7 e 177,7 UFC/g, respectivamente (Tabela 11). Em vista da pequena variação entre as altitudes dos pontos coletados na região de Ellsworth, a relação entre os pontos de coleta e a densidade não foi relevante.

Os índices de diversidade (Fisher's  $\alpha$ ), riqueza (Margalef's) e dominância (Simpson's) apresentaram os valores 1,36, 1,18 e 0,88, respectivamente, todos coerentes com os intervalos de confiança. Os índices de Fisher e Margalef foram baixos, corroborando com a baixa diversidade e riqueza de espécies encontradas a partir de rochas da Antártica. O valor encontrado para o índice de Simpson foi menor do que os valores obtidos para as comunidade de fungos de rochas dos demais ecossistemas amostrados, indicando uma maior dominância, comumente encontrada em ambientes extremos, como a Antártica. O esforço amostral da comunidade de fungos de rochas da Antártica continental, demonstrado pela curva de rarefação construída (Figura 20), foi suficiente em relação aos resultados encontrados.

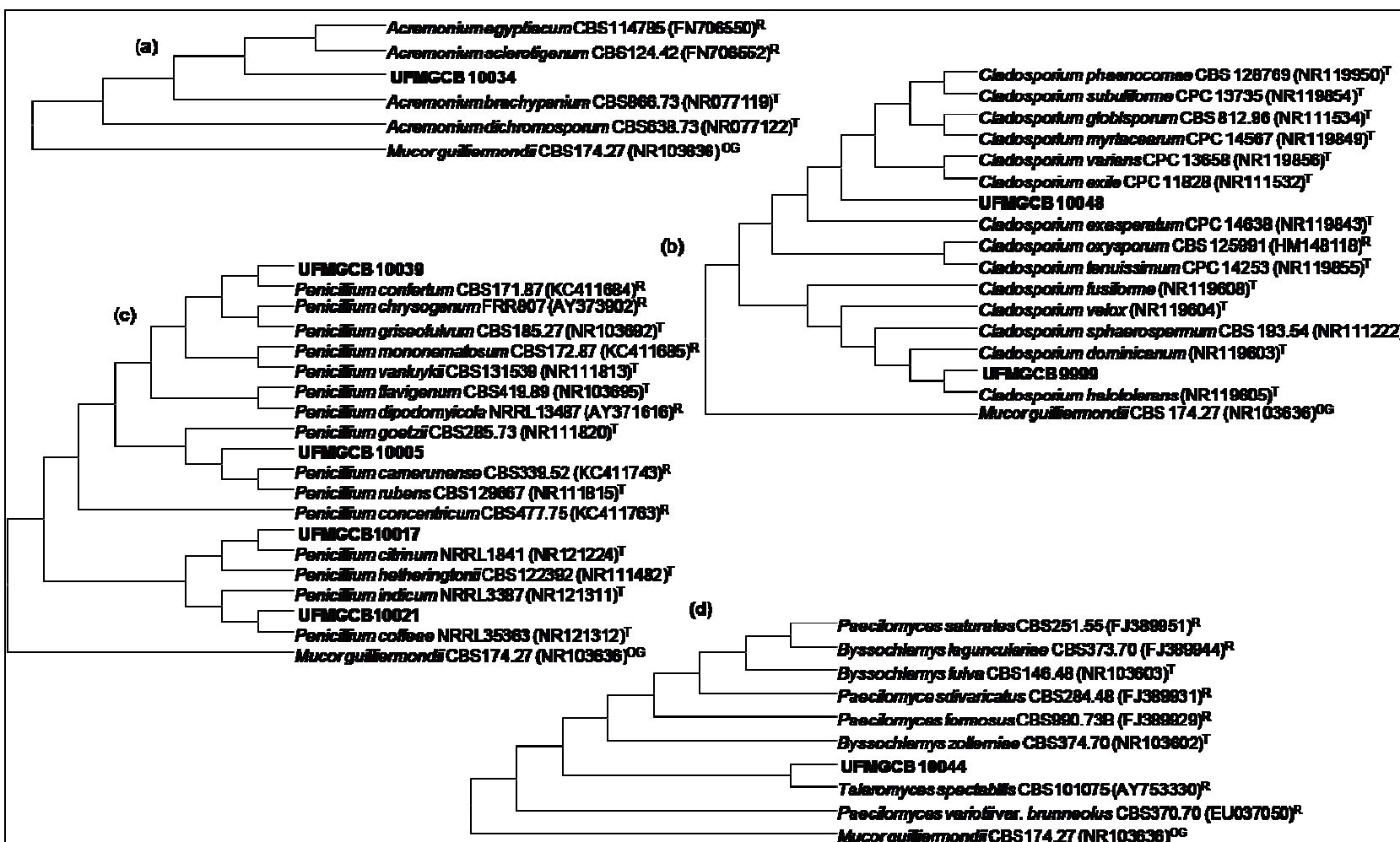
Em relação aos perfis de similaridade (Figura 21) da comunidade fúngica encontrada para os três locais amostrados, a comunidade de fungos obtida do Deserto do Atacama foi mais similar à comunidade de fungos da Antártica continental, enquanto que ambas foram menos similares à comunidade da região da Serra do Caraça, tanto para os índices de Sorensen quanto Bray-Curtis.



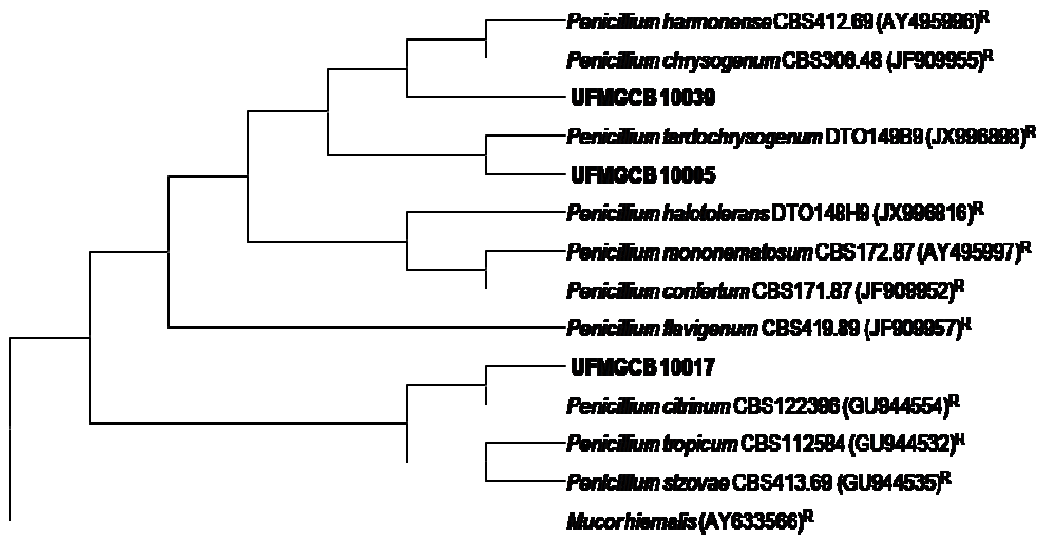
**Tabela 11:** Identificação molecular dos fungos obtidos de rochas da Antártica continental.

Código do UFMGCB <sup>a</sup>	UFC/g	Resultado Top BLAST [n° de acesso do GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto <sup>f</sup>
10039 <sup>b,c,d</sup>	250	<i>Penicillium chrysogenum</i> [NR077145]	100	100	488	<i>Penicillium chrysogenum</i>
10005 <sup>b,c</sup>	185,7	<i>Penicillium rubens</i> [NR111815]	100	100	418	<i>Penicillium tardo-chrysogenum</i>
9999 <sup>b</sup>	177,7	<i>Cladosporium halotolerans</i> [NR119605]	100	99	435	<i>Cladosporium halotolerans</i>
10034 <sup>b</sup>	133,3	<i>Acremonium egyptiacum</i> [FN706550]	99	99	487	<i>Acremonium</i> sp.
AN1AYM1 <sup>e</sup>	131,2	<i>Debaryomyces hansenii</i> [JQ689041]	100	100	498	<i>D. hansenii</i>
10048 <sup>b</sup>	100	<i>Cladosporium phaenocomae</i> [NR119950]	100	100	397	<i>Cladosporium</i> sp.
10017 <sup>b,c</sup>	100	<i>Penicillium citrinum</i> [NR121224]	100	100	446	<i>Penicillium citrinum</i>
10021 <sup>b</sup>	100	<i>Penicillium coffeae</i> [NR121312]	100	98	478	<i>Penicillium</i> cf. <i>coffeae</i>
AN6ADG1 <sup>b,e</sup>	100	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> [AF070432]	100	100	509	<i>Rh. mucilaginosa</i>
10044 <sup>b</sup>	100	<i>Talaromyces spectabilis</i> [AY753330]	95	100	493	<i>Talaromyces spectabilis</i>

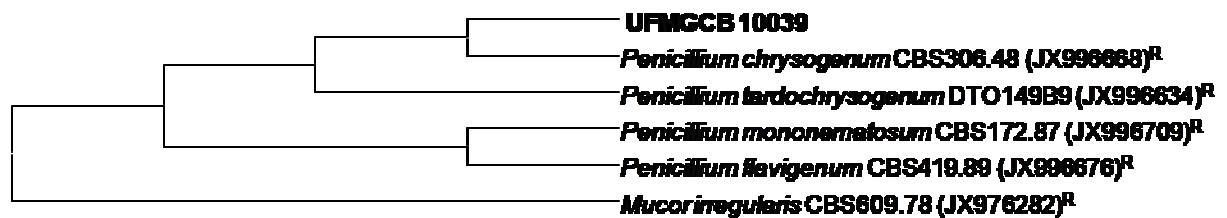
<sup>a</sup>UFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Táxon sujeito a análise filogenética baseada no sequenciamento da região <sup>b</sup>ITS, <sup>c</sup> $\beta$ -tubulina, <sup>d</sup>Polimerase II e <sup>e</sup>D1/D2do RNA ribossomal. <sup>f</sup>Posição taxonômica sugerida.



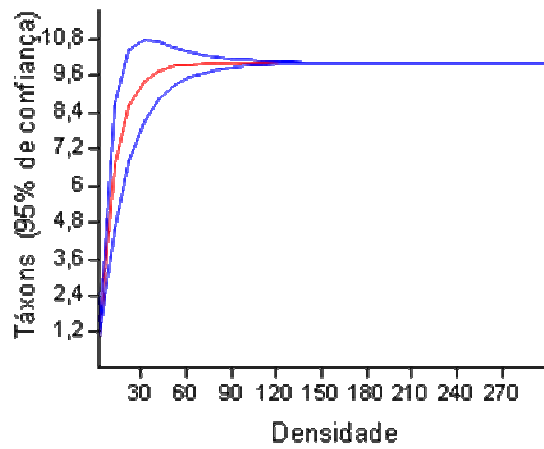
**Figura 17:** Análises filogenéticas das sequências de fungos (em negrito) presentes na Antártica continental em comparação com sequências tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.



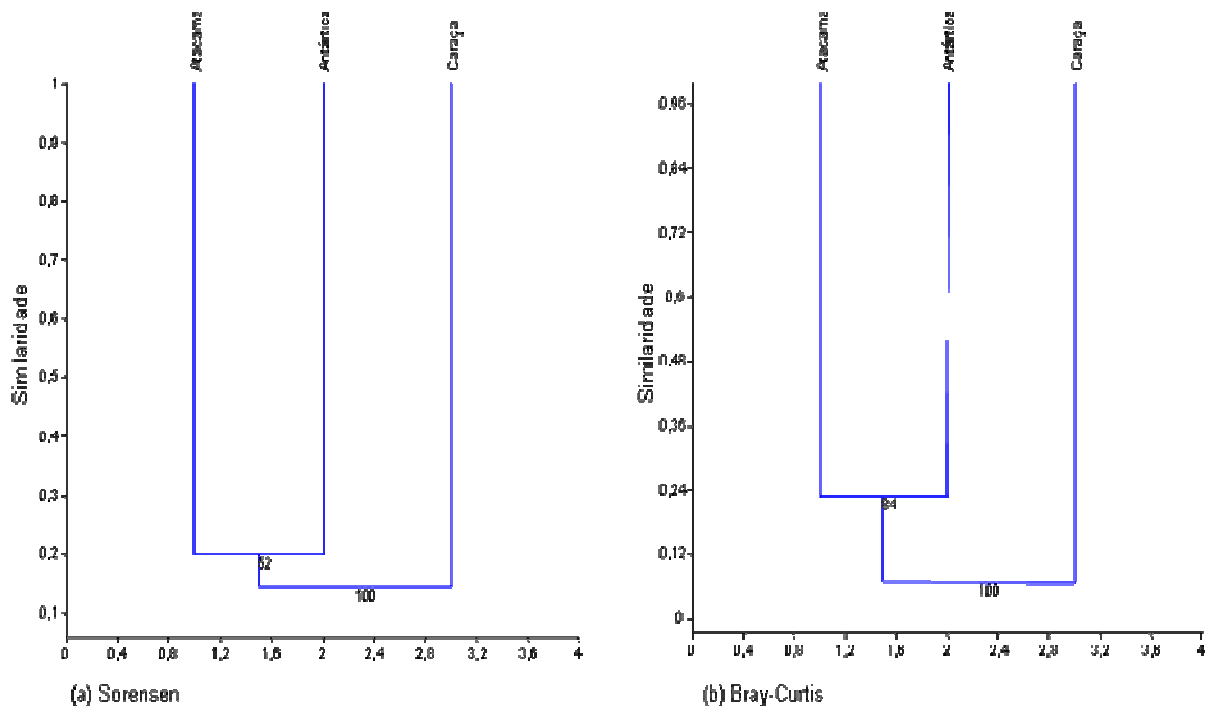
5 **Figura 18:** Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes na Antártica continental em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da  $\beta$ -tubulina, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.



10 **Figura 19:** Análises filogenéticas das sequencias de fungos (em negrito) presentes na Antártica continental em comparação com sequencias tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados GenBank. OG = grupo externo. As árvores foram construídas baseadas nos fragmentos gênicos da RPB II, por meio do parâmetro Composto Máximo de *Likelihood*.



**Figura 20:** Curva de rarefação de táxons (Índice de Mao-Tou) dos fungos obtidos de rochas da Antártica continental, construída com intervalo de 95% de confiança.



5

**Figura 21:** Dendrogramas ilustrando o perfil de similaridade apresentado pelos índices de Sorensen (A) e de Bray-Curtis (B) das comunidades de fúngicas dos três locais amostrados. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições.

10

### 5.3.3 Atividade dos extratos com diclorometano e identificação de metabólitos bioativos

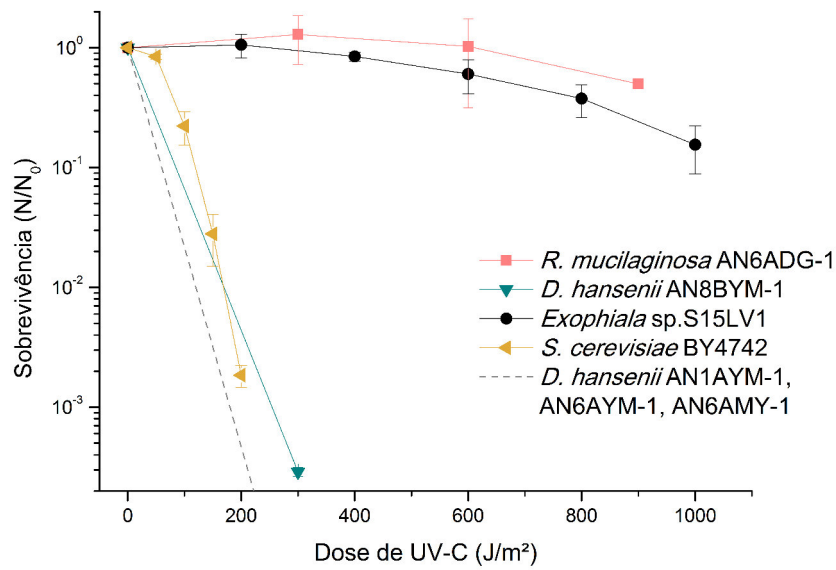
5 Todos os 71 fungos obtidos foram cultivados para a produção de extratos utilizando DCM, os quais foram testados contra os micro-organismos alvos. Os extratos que apresentaram atividade igual ou superior a 70% de inibição foram re-cultivados para cálculo do CIM. O extrato do fungo *Penicillium cf. coffeae* UFMGCB 10021 foi o único que repetiu a atividade inicial e inibiu em 84% o crescimento da levedura *C. albicans* e apresentou CIM de 125 µg/mL.

10 Esse extrato ativo foi então submetido ao RMN <sup>1</sup>H para investigação da presença de substâncias aromáticas. A análise do extrato do fungo *P. cf. coffeae* UFMGCB 100021 mostrou a presença predominante de ácidos graxos. Desta forma, foi acrescentada ao extrato a solução de CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> para a produção de ésteres metílicos que posteriormente foram analisados por meio da CG-FID. Os ácidos graxos identificados no extrato foram palmítico  
15 (29,9%), esteárico (21,1%), oléico (18,4%) e linoléico (30,6%).

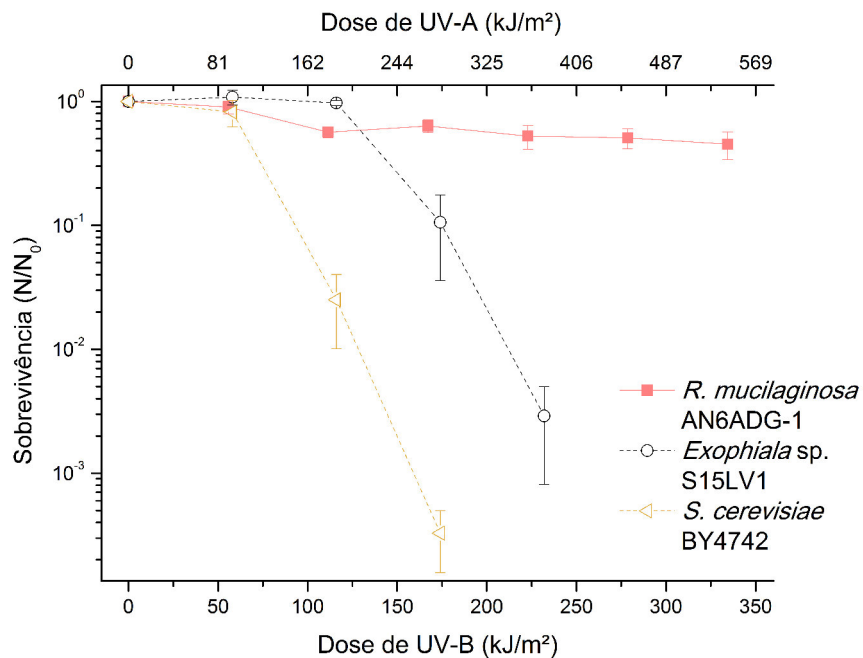
### 5.3.4 Experimentos de astrobiologia

20 Cinco isolados das duas únicas espécies de leveduras isoladas e identificadas como *Debaromyces hansenii* e *Rodothorula mucilaginosa* foram submetidos à avaliação da resistência a radiação UV-C (Figura 22). Todos os isolados de *D. hansenii* apresentam uma drástica queda no crescimento, após a exposição de 300 J/m<sup>2</sup> de radiação UV-C, muito semelhante à levedura utilizada como modelo sensível. Entretanto, o isolado *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 foi capaz de resistir, sem queda substancial da viabilidade, a todas  
25 as intensidades de radiação a que foi exposta, com sobrevivência superior à observada para a levedura *Exophiala* sp. S15LV1.

Tendo em vista que *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 apresentou bons resultados nesta triagem frente à UV-C, a mesma foi então submetida à radiação UV ambiental (Figura 23). Este experimento preliminar teve como objetivo simular a radiação ultravioleta encontrada  
30 no ambiente natural, que é composta principalmente por UVA e UVB. Novamente a *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 foi capaz de resistir a todos os tempos de radiação (de 15 até 90 min) sem perda substancial de viabilidade.



**Figura 22:** Taxa de sobrevivência das leveduras testadas e controles após diferentes doses de radiação UV-C. A sobrevivência é dada pela razão da contagem de UFC/mL após exposição pela contagem de UFC/mL no tempo de exposição igual a 0. Leveduras testes: 5 *Rhodotorula mucilaginosa* AN6ADG-1 e *Debaromyces hansenii* AN1AYM-1, AN6AYM-1, AN6AMY-1 e AN8BYM-1. Controle sensível: *Saccharomyces cerevisiae* BY4742; controle resistente *Exophiala* sp. S15LV1.



**Figura 23:** Taxa de sobrevivência da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* AN6ADG-1 após a exposição a diferentes doses de radiação ultravioleta ambiental (UV-A e UV-B). Leveduras 10

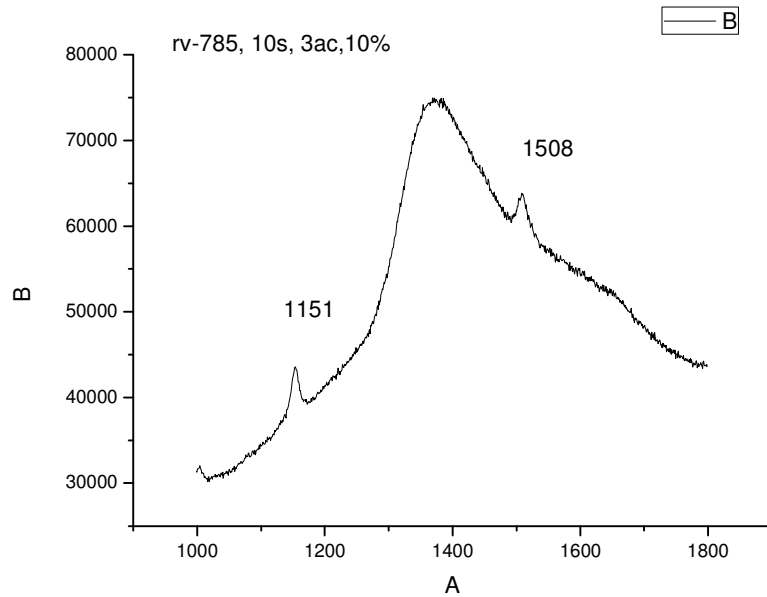
controle (sensível: *Saccharomyces cerevisiae* BY4742; resistente *Exophiala* sp. S15LV1) apresentadas apenas a critério demonstrativo, visto que foram testadas em condições experimentais distintas. Assim, não se pode fazer uma comparação direta e precisa, apenas aproximada.

5

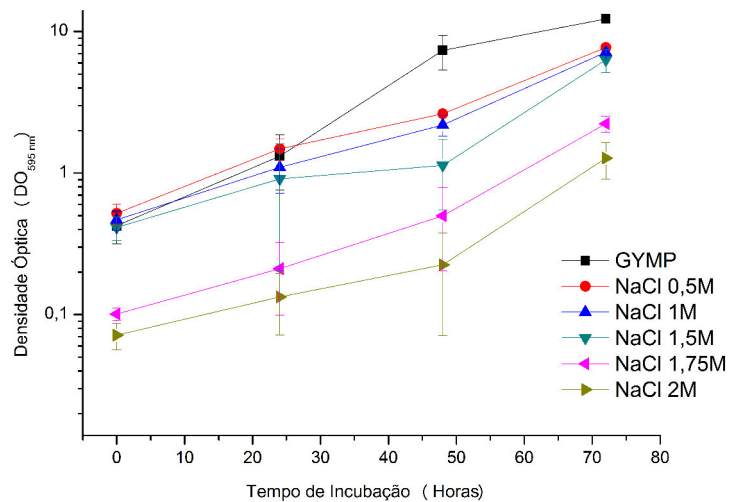
A partir dos resultados de espectroscopia Raman (Figura 24) foi possível detectar a presença de carotenóides na *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 isolada (provavelmente os responsáveis por sua coloração rosácea), pois os sinais entre 1150-1155 e 1505-1515  $\text{cm}^{-1}$  indicativos deste tipo de molécula nesta técnica foram bastante evidentes. Este fato não exclui a possibilidade da existência de outros pigmentos ou outras moléculas fotoprotetoras. No entanto, não foi possível detectar a presença de melanina.

Considerando o fato de que algumas adaptações relacionadas ao estresse hídrico também estão presentes em situações de estresse osmótico (RUISI *et al.*, 2007), *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 também foi submetida ao crescimento frente a diferentes concentrações de sal no meio de cultura (Figura 25). De uma maneira geral, os valores da DO foram menores nos meios de cultura com acréscimo de sal, indicando um menor crescimento, quando comparado a culturas apenas em GYMP em um mesmo tempo de incubação. No entanto, é importante salientar que ainda no tempo de incubação de 72 horas, até a concentração de 2M de sal presente no meio, a levedura foi capaz de crescer, aumentando em mais de 10x sua DO, sugerindo tolerância ao estresse osmótico. Todavia, esses resultados são preliminares e devem ser repetidos com a presença de leveduras que possam ser usadas como controles sensíveis e resistentes ao sal, além da necessidade de testar concentrações ainda maiores para estimar o limite de sobrevivência e crescimento da *R. mucilaginosa* AN6ADG-1.

25



**Figura 24:** Espectro Raman da levedura *Rhodothorula mucilaginosa* AN6ADG-1 para detecção de pigmentos fotoprotetores. Os picos mais estreitos indicam, em conjunto, a assinatura característica de carotenóides. A elevação no centro do espectro se deve à fluorescência, uma interferência comum em amostras biológicas causada por matéria orgânica em geral.



**Figura 25:** Medida indireta do crescimento pela densidade óptica de cultivos da levedura *Rhodothorula mucilaginosa* AN6ADG-1 em meios de cultura GYMP, com diferentes concentrações de NaCl, até 72 horas de incubação.



## 6. Discussão

### 6.1 Coleta e isolamento de fungos

5 Ao final de todas as coletas foram obtidos 66 fragmentos de rochas de todos os ambientes amostrados e deles obtidos 444 isolados fúngicos. A proporção do crescimento de fungos entre os meios de cultura utilizados variou de acordo com o ambiente amostrado. Com as amostras da Serra do Caraça (Figura 2), a maior densidade foi obtida a partir dos meios YM (37%) e MYEA (34%). Da mesma forma, no continente Antártico (Figura 15), o maior crescimento também foi observado a partir do meio YM (47%). Esses resultados podem ser explicados devido à variação e disponibilidade de nutrientes dos meios de cultura utilizados. Os meios YM e MYEA são ricos em nutrientes e não possuem antifúngicos em sua constituição. No entanto, para as amostras do Deserto do Atacama (Figura 8), a maior densidade foi encontrada no meio DG-18 (48%), enquanto que para as amostras da Antártica a proporção foi de 28%. Estes resultados podem ser explicados pelo fato do meio de cultura DG18 ser um meio xerofílico, pois possui em sua composição 18% de glicerol, o que pode ter proporcionado uma condição favorável ao crescimento de fungos adaptados à condição de escassez de água, como se observa nos ambientes como o Deserto do Atacama e Antártica. Resultados similares foram obtidos por Godinho *et al.* (2015), que utilizaram para o isolamento de fungos de solo do continente Antártico os mesmos meios de cultura utilizados no presente estudo e encontraram alguns isolados que foram capazes de crescer no meio DG-18, indicando uma possível capacidade dos mesmos de crescer em condições xerofílicas.

25 Os meios DRBC e DG18 possuem antifúngicos em sua constituição que inibem o crescimento de alguns grupos fúngicos contaminantes que crescem rapidamente por toda a placa. Um dos antifúngicos presentes em ambos os casos é o Dicloram. Este antifúngico é capaz de inibir fungos do gênero *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* e *Sclerotium* spp., ausentes em todos os locais amostrados. Além do Dicloran, o meio DRBC também possui em sua constituição o antifúngico Rosa de Bengala que além de antibacteriano, também é capaz de restringir o crescimento de colônias de fungos de crescimento rápido, facilitando a contagem de colônias e permitindo o isolamento de fungos de crescimento lento. Isto explica o fato de ter sido o meio com o menor número de isolados em todos os locais de coleta [Serra do Caraça (3%), deserto do Atacama (10%) e continente Antártico (1%)].

## 6.2 Identificação dos fungos

Quatrocentos e quarenta e quatro fungos foram obtidos, caracterizados e submetidos à identificação molecular. Após as análises filogenéticas foi possível identificar 389 isolados, sendo a maior parte deles *Ascomycota* (98,9%). Apenas quatro isolados de leveduras foram representantes do filo *Basidiomycota*, identificados como pertencentes às classes *Tremellomycetes* (*Bandoniozyma* sp., *Bullera* sp. e *Cryptococcus podzolicus*) e *Microbotryomycetes* (*Rhodotorula mucilaginosa*). De acordo com Ruisi *et al.* (2007), fungos *Ascomycota* no estágio anamorfo são encontrados com maior frequência na Antártica, pois parecem evitar a reprodução sexuada poupando tempo e energia em prol de finalizar o ciclo de vida. Por outro lado, Tsuji *et al.* (2013) encontraram maior número de *Basidiomycota* ao avaliar a diversidade de fungos em sedimentos e solos ao redor de lagos antárticos.

As razões pelas quais alguns fungos não puderam ser identificados (12,3%) podem ser explicadas por problemas nos procedimentos para extração do DNA e/ou obtenção de amplicons, baixa identidade e/ou cobertura das sequências, além de informações inconclusivas, ao comparar as sequências obtidas com as sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no Genbank. Em alguns casos a não amplificação pode estar relacionada à qualidade do DNA bruto obtido no processo de extração, o qual pode conter contaminantes tais como, proteínas, agentes caotrópicos, pigmentos, dentre outros que inibem a ação da Taq DNA polimerase (NILSSON *et al.*, 2009). Em outros casos, não foi possível obter DNA com quantidades suficientes (50 ng) para realização da reação da PCR, o que pode estar relacionado à dificuldade de rompimento da parede celular fúngica e, conseqüente, disponibilização do material genético. Tais problemas de identificação também foram observados em estudo de caracterização da diversidade de fungos melanizados de monumentos de Mármore na Turquia, onde Sert *et al.* (2007) obtiveram 99 isolados a partir de 250 amostras. Os isolados de fungos foram identificados como pertencentes a ordens comuns, como algumas encontradas no presente trabalho: *Dothideales*, *Chaetothyriales* e *Pleosporales*; no entanto 27 táxons não puderam ser identificados.

Com os resultados obtidos foi possível observar que alguns táxons (*Arthrocatena* sp., *Cladophialophora* sp., *Devriesia* sp., *Herpotrichiellaceae* sp., *Neophaeothecoidea* sp., *Paraconiothyrium* sp., *Pezizomycotina* sp., *Pseudotaeniolina* sp. e *Teratosphaeriaceae* sp.) de rochas da Serra do Caraça foram abundantes, apresentando contagens superiores a 300 UFC/g (Tabela 1), os quais pertencem às classes *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes* e *Pezizomycotina*. Já em relação aos fungos obtidos de rochas do Deserto do Atacama (*Cladosporium* cf. *myrtacearum*, *Penicillium* cf. *citrinum* e *P. crysogenum*, pertencentes às classes *Dothideomycetes* e *Eurotiomycetes*, também apresentaram contagem >300 UFC/g. Em contrapartida, os resultados obtidos com as rochas do

continente antártico (Tabela 11), nenhum táxon apresentou altos valores de densidade, sendo a maior entre eles de 250 UFC/g para o fungo *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 10039. A classe com maior abundância em todos os locais de coleta foi *Eurotiomycetes*. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com Ruibal *et al.* (2008), que encontraram em rochas da região central da Espanha abundância de fungos das classes *Dothideomycetes* e *Eurotiomycetes*. Godinho *et al.* (2015) encontraram em solos da Antártica continental fungos identificados como pertencentes às classes *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Letiomycetes*, *Saccharomycetes* e *Sordariomycetes*.

De acordo com Egidi *et al.* (2013), a maior parte dos fungos presentes em rochas está filogeneticamente relacionada com fungos da classe *Dothideomycetes*, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo com rochas da Antártica, Deserto do Atacama no Chile e Campo de Altitude do Brasil. Egidi *et al.* (2013) caracterizaram *Arthrocatena tenebrio* (código de acesso no GenBank KF309948), uma espécie nova classificada como mesofílica pelo melhor crescimento a 24 °C do que a 6 °C. *Arthrocatena tenebrio* foi a espécie mais próxima filogeneticamente a *Arthrocatena* sp. UFMGCB 6979 obtida de rochas do Campo de Altitude da Serra do Caraça e com abundância superior a 300 UFC/g. Egidi *et al.* (2013) também analisaram a posição taxonômica de algumas espécies de *Devriesia* obtidas de rochas da Antártica, bem como espécies filogeneticamente próximas a *Pseudotaeniolina globosa* e *Teratosphaeriaceae*. Dentre os táxons encontrados na Serra do Caraça, com contagens acima de 300 UFC/g, estão *Devriesia* sp., *Pseudotaeniolina* sp. e *Teratosphaeriaceae* sp., sendo que o primeiro táxon também foi isolado de rochas do Atacama, como parte minoritária (singletos) dentro da comunidade de fungos.

O gênero *Cladophialora* (com contagem >300UFC/g) foi encontrado apenas em rochas do Campo de Altitude da Serra do Caraça, Brasil e foi proposto por Borelli (1980) para abrigar agentes causadores da cromoblastomicose, como por exemplo, *Cladophialophora carrionii*, os quais possuem melanina como um fator de virulência determinante na sua patogenicidade. No entanto, atualmente este clado abriga espécies ambientais associadas a plantas (DE HOOG *et al.*, 2007), musgos (DAVEY & CURRAH, 2007), isolados de refrigerantes (CROUS *et al.*, 2007) e solos poluídos com hidrocarbonetos (BADALI *et al.*, 2008). *Herpotrichiellaceae* sp. UFMGCB 6976 apresentou sequência com baixa identidade em comparação com a espécie *Cladophialophora modesta* (código de acesso no GenBank NR121459), a qual é conhecida como neurotrófica por causar infecções cerebrais (HORRÉ & DE HOOG 1999). De acordo com Quaedvlieg *et al.* (2014), a família *Herpotrichiellaceae* foi recentemente estabelecida para agregar espécies de fungos sapróbios, extremófilos, oportunistas de humanos e patógenos de plantas. Ainda dentro dessa família, encontra-se o gênero *Neophaeothecoidea*, que foi o mais abundante dentre

as leveduras identificadas nas rochas do Campo de Altitude na região da Serra do Caraça. *Neophaeothecoidea* sp. 08BDG-2 apresentou sequencia similar a *Neophaeothecoidea proteae* (código de acesso no GenBank KF937228). Essa espécie foi inicialmente alocada dentro do gênero *Phaeothecoidea*, no entanto, a partir de novas análises taxonômicas do  
5 isolado obtido de folhas da planta *Protea repens*, na África, Quaedvlieg *et al.* (2014) propuseram o novo gênero e conseqüentemente a nova espécie, *Neophaeothecoidea proteae*.

Outro táxon abundante encontrado em rochas do Campo de Altitude foi *Paraconiothyrium* sp. UFMGCB 7073, o qual apresentou sequencia similar a  
10 *Paraconiothyrium archidendri* (código de acesso no GenBank JX496049), uma espécie obtida de manchas das folhas da planta *Archidendron bigeminum* (VERKLEY *et al.*, 2014).

O último táxon com maior abundância encontrado nas rochas do Campo de Altitude da região da Serra do Caraça foi *Pezizomycotina* sp. *Pezizomycotina* é um subfiló de *Ascomycota* e inclui inúmeras espécies que crescem formando filamentos, os quais são  
15 capazes de produzir esporomas e degradam a biomassa de açúcares livres para usar como fonte de energia (ARVAS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010). No presente trabalho, o fungo UFMGCB 6982 apresentou sequencia com maior identidade em comparação com as sequencias de *Cladosporium varians* (código de acesso no GenBank NR119856) e *Aspergillus marvanovae* (HE974387) em análise realizada levando em consideração as  
20 regiões ITS e  $\beta$ -tubulina, respectivamente. A explicação para tal fato, pode ser devido à ausência de sequencias de mais espécies tipos ou de referência de  $\beta$ -tubulina e RPBII depositadas no GenBank. Dessa forma, o fungo foi identificado como *Pezizomycotina* sp., uma vez que *Aspergillus* e *Cladosporium* pertencem a diferentes classes, mas ambos são *Pezizomycotina*.

O gênero *Cladosporium* foi detectado em todas as áreas de coleta e incluiu espécies com as maiores contagens. *Cladosporium halotolerans*, por exemplo, foi isolado de rochas em cinco das oito altitudes amostradas no Deserto do Atacama, Chile, enquanto na Antártica continental apresentou 177,7 UFC/g. O gênero *Cladosporium* é considerado cosmopolita, possui melanina na composição de sua parede e é frequentemente isolado do  
30 diferentes tipos de solos, incluindo os de desertos (STERFLINGER *et al.*, 2012). Na Antártica, *Cladosporium* foi isolado de diferentes substratos como madeira em decomposição, sedimento de lagos, solo, 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;  
35 BLANCHETTE *et al.*, 2010).

*Cladosporium halotolerans* UFMGCB 8042 apresentou sequencia com similaridade próxima a de *C. halotolerans* CBS 280.49 (EF101432) (Figura 12) isolado de caules da

planta *Hypericum perforatum*. De acordo com Zalar *et al.* (2007), *C. halotolerans* também foi detectado em águas de salinas e outros ambientes com alto teor de sal, sendo possivelmente uma espécie intimamente ligada a ambientes salinos ou hipersalinos, entretanto, uma amostragem maior seria necessária para comprovar tal informação.

5 Outro gênero encontrado em todos os locais onde foram coletadas rochas foi *Penicillium*. *Penicillium chrysogenum* foi um dos táxons mais abundantes tanto em rochas no Deserto do Atacama como na Antártica, sendo que neste último ambiente, também foi encontrada a espécie *Penicillium tardochrysogenum* (UFMGCB 10039) com altas contagens de UFC/g. Dentre os 12 gêneros isolados por Conley *et al.* (2006) em amostras de areia do  
10 Deserto do Atacama, o gênero *Penicillium* foi presente. Espécies de *Penicillium* também são comumente isoladas e parecem estar adaptadas as condições extremas da Antártica, sendo encontradas em substratos como solo e madeira em decomposição (ARENZ *et al.*, 2006), lagos (GONÇALVES *et al.*, 2012), macroalgas (LOQUE *et al.* 2010; GODINHO *et al.*, 2013; FURBINO *et al.*, 2014), sedimento marinho (GONÇALVES *et al.*, 2013), permafrost  
15 (ZUCCONI *et al.*, 2012) e solos (GODINHO *et al.*, 2015). Assim como no presente estudo, a espécie *P. chrysogenum*, conhecida como um fungo extremófilo, foi dominante em amostras de permafrost (ZUCCONI *et al.*, 2012) e talos das macroalgas *Adenocystis arcta*, *M. hariotii*, *P. decipiens* e *Ulva intestinalis* (FURBINO *et al.*, 2014).

O gênero *Aspergillus* foi encontrado em amostras de rocha do Deserto do Atacama,  
20 Chile e no Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, Brasil. Dentre as espécies do gênero que foram identificadas a partir de rochas do Atacama estão *A. persii*, *A. sydowii* e *A. westerdijkiae*, todas consideradas minoritárias dentro da comunidade. Entretanto, *A. sydowii* foi encontrado por Godinho *et al.* (2015) como uma das espécies dominantes dentro da comunidade fúngica de solos oligotróficos da região continental da Antártica. De acordo com  
25 Kis-papo *et al.* (2001), onde a característica do solo de desertos é combinada por uma alta salinidade, como por exemplo em solos próximos ao mar morto, existe um seleção de fungos halofílicos e halotolerantes, que incluem espécies como *A. sydowii*.

Três gêneros também foram encontrados em pelo menos dois locais amostrados no presente estudo, sendo *Acremonium* encontrado na Antártica continental e região da Serra  
30 do Caraça. E *Alternaria* e *Hypoxylon* encontrados no Deserto do Atacama e Campo de Altitude. Espécies de *Acremonium* são frequentemente encontradas em amostras de solo da Antártica (SINGH *et al.*, 2006); enquanto espécies de *Alternaria* são frequentemente encontradas em solos de desertos (STERFLINGER *et al.*, 2011). Por outro lado, pelo nosso conhecimento espécies de *Hypoxylon* ainda não foram encontradas em estudos de  
35 diversidade de fungos em desertos.

Ruibal *et al.* (2008) estudaram a diversidade de fungos melanizados em quatro formações rochosas na Espanha e obtiveram 266 isolados fúngicos a partir de amostras da

superfície de rochas de quatro locais geológica e topograficamente distintos. As amostras de rocha foram lavadas com etanol 96%, antes do processamento e a camada mais superficial foi removida. Além disso, após o aparecimento de fungos de crescimento rápido, estes foram removidos rapidamente para não impedir o crescimento daqueles de crescimento lento. Essa metodologia proporcionou a ausência de isolamento de táxons cosmopolitas, como por exemplo, *Penicillium* e *Alternaria*. Apesar da diferença entre a metodologia de processamento deste trabalho e a do presente estudo, foi possível encontrar alguns táxons em comum, principalmente, considerando aqueles isolados a partir de rochas do Campo de Altitude da região da Serra do Caraça, como por exemplo, *Lecythophora* sp., *Exophiala* sp., *Cladophialophora* sp. e *Phoma* sp. De acordo com Ruibal *et al.* (2008), a superfície de rochas é conhecida por ser um reservatório de fungos fortemente melanizados, sendo eles filamentosos e fungos leveduriformes de crescimento lento.

Outro ponto importante da pesquisa de Ruibal *et al.* (2008) é que parte da micota presente na superfícies das rochas também está presente em superfícies de plantas e em formações rochosas na Europa e Antártica. De uma maneira análoga a essa informação, alguns táxons (com, por exemplo, espécies de *Acremonium*, *Alternaria* e *Phaeospora*) encontrados em rochas de Campo de Altitude da RPPN do Caraça também foram encontrados por Vaz *et al.* (2009), a partir do isolamento de fungos endofíticos isolados de indivíduos da família *Orchidaceae*, coletados em diferentes locais da Serra do Caraça. Esses dados sugerem que espécies encontradas em substratos como as folhas, caules e raízes de plantas também podem ser habitantes de rochas.

Assim como os autores que estudaram a comunidade fúngica presente em areias do Deserto do Atacama (CONLEY *et al.*, 2006) e de madeira em decomposição de patrimônios históricos no Chile (ORTIZ *et al.*, 2014), também isolamos de rochas do Deserto do Atacama táxons em comum como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eupenicillium* e *Penicillium*. Em contraste, os gêneros *Cochliobolus*, *Devriesia*, *Fusarium*, *Hypoxyylon*, *Macroventuria*, *Neosartorya* e *Pseudogymnoascus*, até então ainda não foram descritos para região. Com relação ao gênero *Pseudogymnoascus*, este foi historicamente considerado um representante do estágio sexual do gênero *Geomyces* e recebia nomes distintos de acordo com o sistema de classificação. Mas para Minnis & Lindner (2013), *Pseudogymnoascus* e *Geomyces* tratam-se de dois gêneros distintos e filogenicamente próximos de acordo com a posição taxonômica das espécies tipo. Espécies de *Pseudogymnoascus*, anteriormente conhecidas como *Geomyces*, são frequentemente isoladas de amostras de ambientes frios, solos, sedimento de lagos e marinho da Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2015). *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8082 foi encontrado em rochas do Deserto do Atacama somente na altitude de 4.032 m, sendo o primeiro relato deste gênero na região.

Segundo Godinho *et al.* (2015), alguns táxons comumente encontrados nos solos da Antártica continental pertencem aos gêneros *Debaryomyces*, *Cladosporium* e *Penicillium*, os quais também foram comuns ao presente estudo. Por outro lado, gêneros como *Acremonium*, *Talaromyces* e *Rhodotorula* também foram obtidos das rochas da Antártica continental. Sabe-se que as leveduras são capazes de crescer nas baixas temperaturas encontradas na Antártica, sugerindo que elas são capazes de degradar compostos orgânicos em baixas temperaturas e permanecer metabolicamente ativas (AMATO *et al.*, 2009). A maior parte das leveduras isoladas de substratos antárticos é composta por espécies do filo *Basidiomycota*, apesar de representantes de *Ascomycota* também serem isolados. No atual trabalho, representantes de ambos os filios foram caracterizados, sendo representados por *Debaryomyces hansenii* AN1AYM1 (*Ascomycota*) e *Rhodotorula mucilaginosa* AN6ADG1 (*Basidiomycota*). Porém o maior número de isolados e maior contagem determinada foram de *D. hansenii*. Vaz *et al.* (2011) também identificou as mesmas espécies de levedura da rizosfera da gramínea antártica *Deschampsia Antarctica*, solo e água de lagos da Península Antártica.

### 6.3 Diversidade da comunidade fúngica

De uma maneira geral, os índices de diversidade (Fisher  $\alpha$ , Margalef e Simpson) determinados para as três áreas estudadas foram diferentes. Os menores valores foram encontrados para comunidade fúngica presente nas rochas da Antártica Continental, que foi menor que os encontrados no Deserto do Atacama e menor que os das rochas do Campo de Altitude da região da Serra do Caraça.

A Antártica é conhecida por ser um continente distante e inóspito, com o clima mais frio e seco do planeta (RUISI *et al.*, 2007). O Deserto do Atacama está localizado entre as latitudes 17° e 27° no norte do Chile e tem sido considerado o deserto mais antigo e árido do planeta, onde as médias anuais de chuva são frequentemente mais baixas do que 2 mm (AZUA-BUSTOS *et al.*, 2012). Algumas regiões do Deserto do Atacama não têm precipitação por décadas (CONLEY *et al.*, 2006), enquanto que os registros sedimentares sugerem que o clima semi-árido a hiper-árido teve início desde o período Jurássico (HARTLEY *et al.*, 2005; CLARKE 2006). Apesar das condições do clima mais ameno em relação a desertos e regiões polares, os Campos de Altitude são caracterizados pela presença de solos pobres e pela intensa radiação solar, fatores que limitam a diversidade nesses ambientes (BÜNGER *et al.*, 2014). Ainda assim, a diversidade de fungos presentes em ambientes tropicais é maior do que a diversidade de outros ambientes considerados temperados, polares ou áridos. Desta forma, a diversidade, riqueza e dominância

encontradas podem ser reflexos das características ambientais de cada ambiente amostrado no presente estudo.

O índice de Simpson indica a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso da comunidade pertencer a espécies diferentes, atribuindo assim maior peso para a equitabilidade. Portanto, os maiores valores deste índice indicam uma maior dominância e menor diversidade; já os menores valores indicam uma maior diversidade e ausência de dominância. Considerando então os valores obtidos, a diversidade da comunidade de fungos habitantes das rochas do ambiente de Campo de Altitude do Brasil e do Deserto do Atacama são maiores enquanto que a dominância de espécies é maior na Antártica Continental. Estes resultados são reflexos do menor número e diferenças das contagens dos táxons nesse último ambiente.

Conforme os dados obtidos para a comunidade de fungos habitantes das rochas da Antártica, Godinho *et al.* (2015) também encontraram índices semelhantes ao analisar a comunidade de fungos de solo da região continental antártica, onde os valores de riqueza (1,25) e diversidade (1,42) foram baixos e o valor para abundância (0,8) foi igual, indicando uma alta dominância de alguns táxons presentes.

A similaridade calculada pelos índices de Sorensen e Bray-Curtis, entre as comunidades de fungos obtida de rochas do presente trabalho (Figura 21), foi maior entre as comunidades fúngicas do Deserto do Atacama e da Antártica continental. Os índices de riqueza, diversidade e dominância encontrados para a comunidade de fungos de rochas do Deserto do Atacama e da região da Serra do Caraça, são mais semelhantes entre si. No entanto, o coeficiente de Sorensen utiliza dados binários (presença ou ausência) e atribui maior peso sobre as ocorrências comuns do que desencontros. Foi possível observar que as comunidades do Deserto do Atacama e da Antártica continental, apesar de não compartilharem nenhum táxon, presente apenas nesses ambientes, apresentam vários táxons ausentes, que foram encontrados apenas no Campo de Altitude do Brasil. Esses resultados explicam a similaridade obtida entre as comunidades de fungos dos ecossistemas avaliados no presente estudo e sugerem mais uma vez que a mesma pode ser influenciada pelas condições de cada ambiente.

#### **6.4 Atividade biológica, purificação e identificação de metabólitos bioativos**

Dos 444 extratos produzidos e testados, 6,7% (30) apresentaram atividade contra pelo menos um dos alvos testados nos ensaios biológicos realizados. Este valor está coerente com o que se observa em trabalhos de bioprospecção de fungos extremófilos. Como exemplo, 2,5% dos 239 isolados de fungos obtidos por Furbino *et al.* (2014) e 14,7%



dos 115 isolados obtidos por Godinho *et al.* (2015) apresentaram atividade contra pelo menos um dos alvos utilizados nos respectivos trabalhos.

O único isolado que manteve a atividade, mesmo após o ensaio realizado com o extrato produzido com DCM, foi *Acremonium* sp. UFMGCB 7138. Dessa forma, esse isolado  
5 foi submetido à análise de RMN <sup>1</sup>H e, posteriormente, a análise em CG-FID, o que possibilitou a identificação de diferentes ácidos graxos. De acordo com Strobel *et al.* (1997), espécies do gênero *Acremonium*, endofíticas de *Taxus baccata*, produzem leucina estatina A, com atividade antifúngica e anticâncer. Diferente da atividade contra *C. sphaerospermum*, encontrada com o isolado *Acremonium* sp. UFMGCB 7138 no presente trabalho, Vaz *et al.*  
10 (2009) também observaram atividade no isolado identificado como *Acremonium strictum*, fungo endofítico de orquídea coletada na região da Serra do Caraça, o qual exibiu CIM >1 mg/mL para as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella thyphimurium*.

*Pestalotiopsis australasiae* UFMGCB 7188, obtido de rochas do Campo de Altitude da Serra do Caraça, apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*. Vieira *et al.* (2014)  
15 encontraram fungos endofíticos isolados de *Baccharis trimera* e identificados como *Pestalotiopsis* sp., com atividade antifúngica contra *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Cryptococcus gatti*. Algumas espécies de *Pestalotiopsis* têm sido isoladas de ambientes extremos e relatadas como produtoras de metabólitos com atividade biológica (TEJESVI *et al.*, 2007). Um exemplo é a espécie *Pestalotiopsis*  
20 *microspora*, isolada da planta *Taxus* sp. presente no Himalaia, que produz a substância anticancerígena Taxol (STROBEL *et al.*, 1996).

Outro isolado com atividade antibacteriana contra *E. coli* foi *Cladosporium* cf. *pini-ponderosae* UFMGCB 7189. Brunati *et al.* (2009) ao isolar fungos de sedimento de lagos antárticos também encontraram táxons dentro do gênero *Cladosporium* com atividade  
25 antimicrobiana (*E. coli*) e citotóxica (células preditivas de câncer de cólon do útero).

Espécies dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hypoxylon* e *Penicillium* ocorrem em habitats de diferentes ambientes e são capazes de produzir metabólitos secundários com distintas atividades biológicas. Estes gêneros foram obtidos das rochas do Deserto do Atacama e apresentaram diferentes tipos de atividade biológica (Tabela 7).  
30 Todos os isolados identificados como *Aspergillus felis* apresentaram atividade citotóxica contra a célula tumoral humana MCF-7. Segundo Frisvad *et al.* (2004), diferentes espécies do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir substâncias como a Ocratoxina A, uma micotoxina frequentemente relacionada à produção de café, arroz e bebidas. No entanto, de acordo com a literatura nenhum metabólito secundário com atividade biológica de *A. felis* e  
35 *A. persii* foi observado até o momento.

Da mesma forma que o isolado *Alternaria* cf. *arborescens* UFMGCB 8018 apresentou atividade contra a bactéria *S. aureus*, Vaz *et al.* (2009) também observaram um CIM de 0,25

mg/mL para o extrato de *Alternaria* sp., endofítico de orquídeas coletadas no Campo de Altitude na região da Serra do Caraça. Os dois únicos isolados no presente estudo, identificados como *F. oxysporum* apresentaram atividade contra o protozoário *T. cruzi*. Espécies de *Fusarium* e a própria espécie *F. oxysporum* tem sido frequentemente relatados como produtores de micotoxinas (WASKIEWICZ *et al.*, 2010). Já o isolado *Hypoxylon* sp. UFMGCB 8020 foi o único a apresentar uma forte e seletiva atividade antiviral contra o vírus da Dengue. Espécies de *Hypoxylon* tem sido descritas como produtoras de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana (QUANG *et al.*, 2005). De acordo com a literatura, apenas um agente antiviral foi descrito pela espécie *H. fragiforme*, o qual apresentou elevada atividade como um inibidor da enzima HIV protease (BILLS *et al.*, 1993). No entanto, nenhum metabólito secundário com atividade antiviral produzido por *Hypoxylon* foi descrito até o momento.

Todos os táxons identificados como *Neosartorya* cf. *udagawae*, obtidos a partir de rochas do Deserto do Atacama, apresentaram atividade citotóxica contra as células tumorais humanas MCF-7. Entre as substâncias produzidas por espécies de *Neosartorya*, a neosartolactona e 7-metil éster inibem a produção de óxido nítrico em macrófagos de camundongos ativados pelo lipopolissacarídeo (LPS) (YANG *et al.*, 2010). A partir de *N. pseudofischeri*, Eamvijarn *et al.* (2012) observaram a produção e isolaram sesquiterpenos cadenene e o derivado de indol euroquevalierina que mostraram atividade citotóxica *in vitro* contra células tumorais humanas. A atividade citotóxica também foi encontrada pelo alcalóide indol sartorimensina, um análogo de triptoquivalina e fiscalinas produzido por *N. Siamensis*, que mostrou atividade inibitória do crescimento *in vitro* de glioblastoma (tumor cerebral) humano U373 e Hs683, células do câncer do pulmão A549, câncer de mama MCF-7 e linhagens de melanoma SKMEL-28 (BUTTACHON *et al.*, 2012). Segundo Eamvijarn *et al.* (2013), diferentes substâncias como o análogo de aszonalenina, um meroditerpeno aszonalenina, acetilaszonalenina, 13-oxofumitremorgim B, aszonapirona A e ácido helvólico, com ação citotóxica também foram isoladas das espécies de *N. fischeri*, *N. laciniosa* and *N. tsunodae*. Entretanto, de acordo com a literatura não há relato de nenhuma substância ativa isolada da espécie *N. udagawae*.

O extrato do fungo *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074, obtido de rochas do Deserto do Atacama, manteve a sua atividade contra a levedura *C. albicans* após o recultivo, além de ter inibido as células MCF-7, o qual foi então fracionado (Figura 14) e as substâncias isoladas, os ácidos graxos  $\alpha$ -linolínico e linoléico, além do ergosterol 5,8-endoperóxido apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana (Tabelas 8 e 9). Apesar dos estudos com ácidos graxos apontarem que estas substâncias são bons herbicidas e por isso comercializadas para este fim (CANTRELL *et al.*, 2012), em geral, sua presença não torna o extrato interessante, pois não possuem seletividade em seu modo de ação. Os

ácidos graxos são conhecidos por possuir diferentes propriedades biológicas, as quais incluem atividades antibacterianas, antimicobacteriana, antimalárica e antifúngica (POHL *et al.*, 2011). A substância ergosterol endoperóxido já foi isolada por Cantrell *et al.* (1999) a partir da parte aérea da planta *Ajuga remota* e apresentou atividade contra a bactéria

5 *Mycobacterium tuberculosis*.

O único extrato ativo obtido de fungo de rochas da Antártica continental, *Penicillium* cf. *coffeeae* UFMGCB 100021, apresentou em sua composição vários ácidos graxos. Esses foram provavelmente responsáveis pela atividade contra a levedura *C. albicans* (MIC de 125 µg/mL). Kozlovskii *et al.* (2012) observaram diferentes metabólitos secundários produzidos

10 por espécies de *Penicillium* isoladas de amostras de *permafrost* coletadas no Ártico e Antártica. A maior parte das substâncias é conhecida como micotoxinas, mas quinazolininas e fumiquinazolininas F and G, com atividade antifúngica também foram encontradas. No entanto, ainda não há relatos de espécies identificadas como *P. coffeeae* a partir de amostras dessas regiões polares.

15

## 6.5 Experimentos de astrobiologia

Micro-organismos expostos ao ambiente espacial receberiam intensa radiação solar, incluindo a radiação UV-C, devido à ausência da camada de ozônio (PAULINO-LIMA *et al.*,

20 2013). Isto é válido também para superfícies planetárias, como em Marte, em que não há uma atmosfera espessa o suficiente para servir como filtro. A radiação UV-C (200 a 280 nm) teve um importante papel no planeta Terra antes do aumento da concentração de oxigênio na atmosfera, mas ainda é abundante acima da camada de ozônio, na estratosfera atual, onde diferentes micro-organismos são encontrados desde 1936 (SMITH *et al.*, 2013). Além

25 disso, a radiação UV-C é uma das mais efetivas radiações utilizadas para inativar micro-organismos, comumente encontrada em laboratórios de microbiologia, sob a forma de lâmpadas germicidas com um pico de emissão em 253,7 nm e, portanto é uma ferramenta acessível para selecionar micro-organismos resistentes ao UV-C.

Diferentes estudos foram realizados com o intuito de avaliar a resistência de alguns

30 micro-organismos a diferentes tipos de radiação e condições encontradas fora do planeta, usando como modelos: bactérias (ORDOÑEZ *et al.*, 2009; PAULINO-LIMA *et al.*, 2011; PAULINO-LIMA *et al.*, 2013), arqueias (FENDRIHAN *et al.*, 2009) e cianobactérias (BILLI *et al.*, 2011). No entanto, poucos estudos foram realizados até o momento com o objetivo de avaliar organismos eucarióticos como modelos em estudos de astrobiologia (MCCREADY *et al.*,

35 *et al.*, 2000; ONOFRI *et al.*, 2008; PULSCHEN *et al.*, 2015).

A levedura *Rodothorula mucilaginosa* AN6ADG-1, obtida de rochas da região continental da Antártica durante a condução desta tese, se mostrou bastante resistente a diferentes doses de radiação UV-C quando comparada aos controles (*Saccharomyces cerevisiae* BY4742 e *Exophiala* sp. S15LV1) e aos demais isolados de *Debaromyces hansenii*, também obtidos de rochas da Antártica. Segundo Paulino-Lima *et al.* (2013), diversas bactérias resistentes à radiação UV-C foram isoladas de solo do Deserto do Atacama. A bactéria mais resistente ao UV-C isolada no estudo, identificada como *Bacillus* sp., apresentou apenas 10% de sobrevivência quando foi irradiada por 318 J/m<sup>2</sup>. Já *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 apresentou uma taxa de sobrevivência maior que esta mesmo após uma dose de radiação de 900 J/m<sup>2</sup>, a qual foi superior até mesmo a tolerância da bactéria *Deinococcus radiodurans* utilizada como controle resistente pelos autores citados.

Ao investigar leveduras isoladas de grandes altitudes de uma área vulcânica do Deserto do Atacama como possíveis modelos eucariotos para estudos de astrobiologia, Pulschen *et al.* (2015) observaram que as leveduras pigmentadas, que indicaram a presença de melanina e carotenóides a partir da espectroscopia Raman, apresentaram bons resultados nos testes com radiação UV-C. Entretanto, não resistiram da mesma forma no ensaio de UV ambiental quando comparado com *R. mucilaginosa* AN6ADG-1. Em contraste com o que foi observado por esses autores, a levedura *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 também exibiu boas taxas de sobrevivência nos experimentos com UV ambiental, apresentando aparentemente mais resistência que a levedura *Exophiala* sp. utilizada como controle. Na espectroscopia Raman foi possível observar a presença de carotenóides (Figura 22). Ainda que mais estudos sejam necessários para mostrar a estratégia da levedura *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 para resistir à radiação UV-C e ambiental, a presença de carotenóides pode ser um fator importante nesses resultados, pois é sabido que carotenóides e melaninas são pigmentos que protegem os micro-organismos da radiação UV (LIBKIND *et al.*, 2009, SINGARAVELAN *et al.*, 2008, MOLINÉ *et al.*, 2010), uma vez que são capazes de absorver a radiação UV em diferentes comprimentos de onda, incluindo o UV-C (WYNN-WILLIAMS & EDWARDS, 2002). Além disso, os carotenóides podem eliminar os radicais livres gerados pela luz UV, conferindo proteção à célula contra danos oxidativos (MOORE *et al.*, 1989; SCHROEDER & JOHNSON, 1993).

Em relação aos testes de salinidade, *R. mucilaginosa* AN6ADG-1 foi capaz de crescer mesmo na presença de até 2M de NaCl, apresentando um crescimento menor quando comparado com o meio de cultura sem a presença de sal, mas ainda assim considerável. De acordo com Lahav *et al.* (2002), outra linhagem de levedura também identificada como *R. mucilaginosa*, obtida da evaporação de águas residuais de indústria química foi capaz de crescer em meio de cultura com o acréscimo de até 2M de NaCl. Butinar *et al.* (2005) isolaram, dentre outras leveduras, a espécie *Rhodotorula laryngis* de

amostras de água de salinas da Costa do Mar Adriático, próxima ao mar Morto. Avaliar a capacidade de micro-organismos de crescer e resistir a altas concentrações de sal promove o entendimento das respostas ao estresse osmótico (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2009) e possibilita caracterizar fungos extremófilos, que podem ser utilizados como modelos para estudos de astrobiologia, uma vez que parte do solo marciano caracteriza-se pela presença de sais de sulfato (FOSTER *et al.*, 2010).

## 7. Conclusões

Com base no presente estudo podemos concluir que:

- As rochas dos ecossistemas de Campo de Altitude no Brasil, Deserto do Atacama, Chile e da Antártica continental, considerados extremos, apresentaram-se como um habitat natural para comunidades de fungos com elevada diversidade, dos quais muitos táxons são candidatos a espécies novas.
- A diversidade da comunidade de fungos que habitam as rochas variou de acordo com o ambiente em que as amostras foram coletadas, mostrando como as características intrínsecas ao ambiente podem influenciar a riqueza e a diversidade encontradas.
- Pelo nosso conhecimento, este trabalho é pioneiro na pesquisa de fungos habitantes de rochas presentes em ecossistemas naturais de Campos de Altitude do Brasil e do Deserto do Atacama, Chile.
- O estudo químico dos extratos bioativos permitiu a identificação de ácidos graxos e o isolamento de substâncias com atividade antifúngica e antibacteriana. Ainda que essas substâncias sejam conhecidas, a comunidade de fungos encontrada pode ser fonte de espécies produtoras de substâncias bioativas, uma vez que diferentes táxons apresentaram atividades biológicas não relatadas até o momento.
- Os resultados de astrobiologia mostraram que rochas da Antártica podem conter fungos modelos eucariotos para os estudos de vida fora do planeta. Ainda que os experimentos tenham sido preliminares, foi possível observar uma forte resistência da levedura *Rodothorula mucilaginosa* AN6ADG-1 à radiação UV-C e ambiental, além da habilidade de crescer em ambiente com alto teor de sal, condições encontradas fora do nosso planeta.

## 8. Referências

- 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.  
5 W.; FRATIL, F.; HOGGM, I. D.; NEWSHAM, K. K.; O'DONNELL, A.; RUSSELLO, N.;  
SEPPELT, 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,  
10 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.
- 15 AMATO, P.; DOYLE, S.; CHRISTNER, B. C. Macromolecular synthesis by yeasts under  
frozen conditions. *Environmental microbiology*, v. 11, p. 589-596, 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.
- 20 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.
- ARENZ, B. E. & BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica  
at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology &  
25 Biochemistry*, v. 43, p. 308-315, 2011.
- ARVAS, M.; KIVIOJA, T.; MITCHELL, A.; SALOHEIMO, M.; USSERY, D.; PENTTILA, M.;  
OLIVER, S. Comparison of protein coding gene contents of the fungal phyla  
Pezizomycotina and Saccharomycotina. *BMC genomics*, v. 8, p. 325, 2007.
- ATALLA, M. M.; ZEINAB, H. K.; EMAN, R. H.; AMANI, A. Y.; ABEER, A. A. E. A.  
30 Physiological Studies on Some Biologically Active Secondary Metabolites from Marine  
Derived Fungus *Penicillium brevicompactum* v. 1, p. 1-15, <http://www.GAte2Biotech.com>,  
2011.
- 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  
35 Biology*, v. 18, p. 128-134, 1997.
- AZUA-BUSTOS, A.; URREJOLA, C.; VICUÑA, R. Life at the dry edge: microorganisms of the  
Atacama Desert. *Febs Letters*, v. 586, p. 2939-2945, 2012.

- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *Studies in Mycology*, v. 61, p. 175-191, 2008.
- 5 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.
- 10 BETANCUR-GALVIS, L.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 94, p. 531-535, 1999.
- BILLI, D.; VIAGGIU, E.; COCKELL, C. S.; RABBOW, E.; HORNECK, G.; ONOFRI, S. Damage Escape and Repair in Dried *Chroococcidiopsis* sp. from Hot and Cold Deserts Exposed to Simulated Space and Martian Conditions. *Astrobiology*, v. 11, p. 65-73, 15 2011.
- BILLS, G. F.; HENSENS, O. D.; KOUPAL, L.; LINGHAM, R. B.; ONDEYKA, J.G.; ZINK, D. L. U.S. Patent No. 5,183,826. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 1993.
- BLANCHETTE, R. A.; HELD, B. W.; Arenz, B. E.; JURGENS, J. A.; BALTES N. J.; DUNCAN, 20 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.
- BOGOMOLOVA, E. V. & MINTER, D. W. A new microcolonial rock-inhabiting fungus from marble in Chersonesos (Crimea, Ukraine). *Mycotaxon*, v. 86, p. 195-204, 2003.
- BORELLI, D. Causal agents of chromoblastomycosis (*Chromomyces*). *Proceedings of the* 25 *5th International Conference on Mycoses* pp. 335-340, 1980.
- BRANDÃO, M.; GAVILANES, M. L.; Araújo, M. G. Aspectos físicos e botânicos de campos rupestres do Estado de Minas Gerais – I. *Daphne*, v. 4, p. 17-38, 1994.
- BREWER, M.S. Traditional preservatives-sodium chloride. In: Robinson RK, Blatt CA, Patel PD (eds) *Encyclopaedia of food microbiology*. Academic Press, London, p. 1723-1728, 30 1999.
- 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.
- 35 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.

- BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA-FLAME, A. C.; VAN-VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents Chemother*, v. 40, p. 2592-2597, 1996.
- 5 BÜNGER, M. D. O.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Myrtaceae throughout the Espinhaço Mountain Range of centraleastern Brazil: floristic relationships and geoclimatic controls. *Acta Botanica Brasilica*, v. 28, p. 109-119, 2014.
- BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, v. 244, p. 229-234,  
10 2005.
- BUTTACHON, S.; CHANDRAPATYA, A.; MANOCH, L.; SILVA, A.; GALES, L.; BRUY\_ERE, C.; KISS, R.; KIJOA, A. Sartorymensen, a new indole alkaloid, and new analogues of tryptoquivaline and fiscalins produced by *Neosartorya siamensis* (KUFC 6349). *Tetrahedron*, v. 68, p. 3253-3262, 2012.
- 15 CAIAFA, A. N. & SILVA, A. F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no parque estadual da serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. *Rodriguésia*, v. 87, p. 163-173, 2005.
- CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial Agents Chemother*, v. 41, p. 818-822, 1997.
- 20 CANTRELL, C. L.; RAJAB, M. S.; FRANZBLAU, S. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial ergosterol-5, 8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta medica*, v. 65, p. 732-734, 1999.
- CANTRELL, C. L.; DAYAN F. E.; DUKE, S. O. Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*. v. 75, p. 1231-1242, 2012.
- 25 CARRASCO, J. F.; CASASSA, G.; RIVERA, A. A warm event at Patriot Hills, Antarctica: an ENSO related phenomenon? *Sixth International conference on southern hemisphere meteorology and oceanography*, 2000. Santiago, American Meteorological Society, Boston, p. 240-241, 2001.
- CARVALHO, C. R.; GONÇALVES, V. N.; PEREIRA, C. B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I. V.;  
30 ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M.E.G.; ZANI, C. L.; ROSA, C.A.; ROSA, L. H. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, v. 57, 2012.
- CARY, S. C.; MCDONALD, I. R.; BARRETT, J. E.; COWAN, D. A. On the rocks: the  
35 microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nature Review Microbiology*, v. 8, p. 129-138, 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),  
5 p. 239-253, 2006.
- CHRISTNER B. C. Bioprospecting for microbial products that affect ice crystal formation and growth. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 85, p. 481-489, 2010.
- CLARKE, J.D.A. Antiquity of aridity in the Chilean Atacama Desert. *Geomorphology*, v. 73, p. 101-114, 2006.
- 10 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). Wayne, Pennsylvania-USA, 2002.
- 15 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – NCCLS document M7-A6; 6 ed. Wayne, Pennsylvania- USA, 2003.
- COCKELL, C. S. & BLAUSTEIN, A. Ecosystems, evolution and UV radiation. *Springer*, New  
20 York, p. 1-225, 2001.
- COCKELL, C. S.; LEE, P.; SCHUERGER, A. C.; HIDALGO, L.; JONES, J. A.; STOKES, M. D. Microbiology and vegetation of micro-oases and polsar desert, Haughton Impact Crater, Devon island, Nunavut, Canada. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, v. 33, p. 306-318, 2001.
- 25 COLWELL, R. K.; MAO, C.X.; CHANG, J. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology*, v. 85, p. 2717-2727, 2004.
- CONLEY, C. A.; ISHKAHNOVA, G.; MCKAY, C. P.; CULLINGS, K. A preliminary survey of non-lichenized fungi cultured from the hyperarid Atacama Desert of Chile. *Astrobiology*, v. 6, p. 521-526, 2006.
- 30 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 Antartic Environments. *Annual Review of Microbiology*, v. 58, p. 649-690, 2004.
- 35 CROUS, P. W.; APTROOT, A.; KANG, J. C.; BRAUN, U.; WINGFIELD, M. J. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Studies in Mycology*, v. 45, p. 107-121, 2000.

- CROUS, P. W.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology*, v. 58, p.1-32, 2007.
- DADACHOVA, E.; BRYAN, R. A.; HUANG, X.; MOADEL, T.; SCHWEITZER, A. D.; AISEN, P.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PloS One* 2, v. 5, p. 1-13, 2007.
- DAVEY, M. L. & CURRAH, R. S. A new species of *Cladophialophora* (Hyphomycetes) from boreal and montane bryophytes. *Mycological Research*, v. 111, p. 106-116, 2007.
- 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, G. S.; SIGLER, L.; UNTEREINER, W. A.; KWON-CHUNG, K. J.; GUÉHO, E.; UIJTHOF, J. M. J. Changing taxonomic concepts and their impact on nomenclatural stability. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 32, p. 113-122, 1994.
- DE HOOG, G. S.; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; EL FAR, I. M.; ENDE VAN DER, A. G. G. H.; MELZER-KRICK, B.; UNTEREINER, W. A. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. *Medical Mycology*, v. 36, p. 52-56, 1998.
- DE HOOG, G. S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPEFELD, T. G.; ATTILI ANGELIS, D.; GERRITS VAN DER, E. A. H. G.; MATOS, T.; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; RAINER, J.; RICHARD-YEGRES, N.; VICENTE, V.; YEGRES, F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology*, v. 38, p. 243-250, 2000.
- DE HOOG, G. S.; NISHIKAKU, A. S.; FERNÁNDEZ ZEPPEFELDT, G.; PADÍN-GONZÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. *Studies in Mycology*, v. 58, p. 219-234, 2007.
- DE LEO, F.; URZÍ, C.; DE HOOG, G. S. A new meristematic fungus, *Pseudotaeniolina globosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 83, p.351-360, 2003.
- DE LEO, F.; CRISEO, G.; UrzÍ, C. Impact of surrounding vegetation and soil on the colonization of marble statues by dematiaceous fungi. In *8th= eighth international congress on deterioration and conservation of stone*, Berlin, 30 Sept.-4 Oct. 1996: *proceedings* p. 625-630, 1996.
- DEL FRATE, G. & CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic material. *Polar Biology*, v. 11, p. 1-07, 1990.
- DEMAIN, A. L. Industrial microbiology. *Science*, v. 214, p. 987-994, 1981.

- DEMING, J. W. Psychrophiles and polar regions. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, p. 301-309, 2002.
- DUTRA, G. M.; RUBBIOLI, E. L.; HORTA, L. S. Gruta do Centenário, Pico do Inficionado (Serra da Caraça), MG. A maior e mais profunda caverna quartzítica do mundo, 2002. SIGEP 20. In: Schobbenhaus, C.; Campos, D. A.; Queiroz, E. T.; Winge, M.; Berbert-Born, M. L. C. (Edit.) 2002. *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP) – Brasília, 554 pp, 2002.
- EAMVIJARN, A.; KIJJOA, A.; BRUY\_ERE, C.; MATHIEU, V.; MANOCH, L.; LEFRANC, F.; SILVA, A.; KISS, R.; HERZ, W. Secondary metabolites from a culture of the fungus *Neosartorya pseudofischeri* and their in vitro cytostatic activity in human cancer cells. *Planta Medica*, v. 78, p1767-. 1776, 2012.
- EAMVIJARN, A., GOMES, N.M., DETHOUP, T., BUARUANG, J., MANOCH, L., SILVA, A.; PEDRO, M.; MARINI, I.; ROUSSIS, V.; KIJJOA, A. Bioactive meroditerpenes and indole alkaloids from the soil fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC 6344), and the marine-derived fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunodae* (KUFC9213). *Tetrahedron*, v. 69, p. 8583-8591, 2013.
- EDWARDS, H. G.; HUTCHINSON, I. B.; INGLEBY, R. Raman spectroscopy and the search for life signatures in the ExoMars Mission. *International Journal of Astrobiology*, v. 11, p. 269-278, 2012.
- EGIDI, E.; DE HOOG, G. S.; ISOLA, D.; ONOFRI, S.; QUAEDVLIEG, W.; DE VRIES, M.; VERKLEY, G. J. M.; STIELOW, J. B.; ZUCCONI, L.; SELBMANN, L. Phylogeny and taxonomy of meristematic rock-inhabiting black fungi in the Dothideomycetes based on multi-locus phylogenies. *Fungal Diversity*, v. 65 p. 127-165, 2014.
- 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.
- FENDRIHAN, S.; BÉRCES, A.; LAMMER, H.; MUSSO, M.; RONTÓ G.; POLACSEK, T. K.; HOLZINGER, A.; KOLB, C.; STAN-LOTTER, H. Investigating the Effects of Simulated Martian Ultraviolet Radiation on *Halococcus dombrowskii* and Other Extremely Halophilic Archaeobacteria. *Astrobiology*, v. 9, p. 104-112, 2009.

- FERRI, M. G.. *Vegetação Brasileira. Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo*, 157p., 1980.
- 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.
- 5 FOSTER, I. S.; KING, P. L.; HYDE, B. C.; SOUTHAM, G. Characterization of halophiles in natural MgSO<sub>4</sub> salts and laboratory enrichment samples: Astrobiological implications for Mars. *Planetary and Space Science*, v. 58, p. 599-615, 2010.
- 10 FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; MCLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUSON, R. M.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate alamar blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 362-366, 1998.
- 15 FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R.A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section Circumdati. *Studies in Mycology*, v. 50, p. 23-43, 2004.
- FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZARI, F. M.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; CARVALHO, A. G. O.; GIL, L. H. V. G.; ROSA, A. C.; MINNIS, A. M; ROSA, L. H. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microbial ecology*, 67, p. 775-787, 2014.
- 20 GILICHINSKY, D. A.; WILSON, G. S.; FRIEDMANN, E. I.; MCKAY, C. P.; SLETTEN, R. S.; RIVKINA, E. M.; VISHNIVETSKAYA, T. A.; EROKHINA, L. G.; IVANUSHKINA, N. E.; KOCHKINA, G. A.; SHCHERBAKOVA, V. A.; SOINA, V. S.; SPIRINA, E. V.; VOROBYOVA, E. A.; FYODOROV-DAVYDOV D, G.; HALLET, B.; OZERSKAYA, S. M.; SOROKOVIKOV, V. A.; LAURINAVICHYUS, K. S.; SHATILOVICH, A. V.; CHANTON, J. P.; OSTROUMOV, V. E.; TIEDJE, J. M. Microbial populations in antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. *Astrobiology*, v. 7, p. 275-311, 2007.
- 30 GLASS, N. L., & DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, 1323-1330, 1995.

- GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N. S.; PUPO, D.; T. M. A.; JUNIOR, P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME journal*, v. 7, 1434-1451, 2013.
- 5
- GODINHO, V. M.; GONÇALVES, V. N.; SANTIAGO, I. F.; FIGUEREDO, H. M.; VITORELI, G. A.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J. G.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; KROON, E. G.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; DUKE, S. O.; ALI, A.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, p. 1-12, 2015.
- 10
- GOMES, J.; GOMES I.; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. *Extremophiles*, v.4, p. 227-235, 2000.
- 15
- GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecology*, p. 1-13, 2012.
- GONÇALVES, V. N.; CAMPOS, L. S.; MELO, I. S.; PELLIZARI, V. H.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. *Polar biology*, v. 36, p. 1823-1831, 2013.
- 20
- GONÇALVES, V. N., CARVALHO, C. R., JOHANN, S., MENDES, G., ALVES, T. M., ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; Rosa, L. H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, p. 1-10, 2015.
- 25
- GOODRICH, R.P.; HANDEL, T.M.; BALDESCHWIELER, J.D. Modification of lipid phase behaviour with membrane-bound cryoprotectants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 938, p. 143-154, 1988.
- GORBUSHINA, A. Microcolonial Fungi: Survival Potential of Terrestrial Vegetative Structures. *Astrobiology*, v. 3, p. 543- 555, 2003.
- 30
- GORBUSHINA, A. A. Life on the rocks. *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 1613-1631, 2007.
- GORBUSHINA, A. A.; KRUMBEIN, W. E.; PANINA, L.; SOUKHARJEVSKI, S.; WOLLENZIEN, U. On the role of black fungi in colour change and

- biodeterioration of antique marbles. *Journal of Geomicrobiology*, v. 11, p. 205-221, 1993.
- GORBUSHINA, A. A.; KOTLOVA, E. R.; SCHULTE, A. Adaptation strategies of microcolonial rock inhabiting fungi subjected to desiccation stress. Presented at the VAAM (German Society for General and Applied Microbiology) Annual Meeting, Oldenburg, Germany, March 2001.
- GORBUSHINA, A. A.; KRUMBEIN, W. E.; VOLKMANN, M. Rock surfaces as life indicators: new ways to demonstrate life and traces of former life. *Astrobiology*, v. 2, p. 203-213, 2002.
- GORBUSHINA, A. A.; WHITEHEAD, K.; DORNIEDEN, T.; NIESSE, A.; SCHULTE, A.; HEDGES, J. Black fungal colonies as units of survival: hyphal mycosporines synthesized by rock dwelling microcolonial fungi. *Canadian Journal of Microbiolog*, v. 81, p. 131-138, 2003.
- GORBUSHINA, A. A.; KOTLOVA, E. R.; SHERSTNEVA, O. A. Cellular responses of microcolonial rock fungi to long-term desiccation and subsequent rehydration. *Studies in Mycology*, v. 61, p. 91-97, 2008.
- GOSTINCAR, C.; GRUBE, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments? *Fungal Biology*, v. 115, p. 1008-1018, 2011.
- GRAHAM, J. M. The Biological Terraforming of Mars: Planetary Ecosynthesis as Ecological Succession on a Global Scale. *Astrobiology*, v. 4, p. 168-196, 2004.
- GRISHKAN, I. & NEVO, E. Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Ramon area, central Negev desert, Israel. *Fungal Ecology*, v. 3, p. 326-337, 2010.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; SONJAK, S.; ZALAR, P.; FRISVAD, J. C.; DIDERICHSSEN, 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.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; RAMOS, J.; PLEMENITAŠ, A. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological research*, v. 113, p. 1231-1241, 2009.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleont Electron* v. 4, p.1-9, 2001.

- HARTLEY, A.J.; CHONG, G.; HOUSTON, J.; MATHER, A. E. 150 million years of climatic stability: evidence from the Atacama Desert, northern Chile. *J Geol Soc*, v. 162, p. 421-424, 2005.
- HORNECK, G. European activities in exobiology in earth orbit: results and perspectives. *Life Sciences: Exobiology*, v. 23, p. 381-386, 1999.
- HORNECK, G.; STÖFFLER, D.; OTT, S.; HORNEMANN, U.; COCKELL, C. S.; MOELLER, R.; MEYER, C.; DE VERA, J-P.; FRITZ, J.; SCHADE, S.; ARTEMIEVA, N. A. Microbial Rock Inhabitants Survive Hypervelocity Impacts on Mars-Like Host Planets: First Phase of Lithopanspermia Experimentally Tested. *Astrobiology*, v. 8, p. 17-44, 2008.
- HORRÉ, R.; DE HOOG, G. S. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Studies in Mycology*, v. 43, p. 176-193, 1999.
- ISOLA D. Biodiversity, phylogeny and evolution of rock black fungi. Tese de Doutorado. [http://dspace.unitus.it/bitstream/2067/1068/1/disola\\_tesid.pdf](http://dspace.unitus.it/bitstream/2067/1068/1/disola_tesid.pdf). 2010.
- JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin. Microbial.* v. 13, p. 708-717, 2000.
- JOHNSON, D. B. Habitats and Characteristics of Extremophilic Microorganisms, microbial adaptation. *Géosciences*, v. 11, 72p, 2010.
- KARENTZ D. Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. In: Weiler CS, Penhale PA (eds) Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects. *American Geophysical Union*, Washington, DC, p. 92-110, 1994.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford, 2008.
- KIS-PAPO, T.; GRISHKAN, I.; OREN, A.; SOLOMON, P. W.; NEVO, E. Spatiotemporal diversity of filamentous fungi in the hypersaline Dead Sea. *Mycological Research*, v. 105, p. 749-756, 2001.
- KOCHKINA, G.; IVANUSHKINA, N.; OZERSKAYA, S.; CHIGINEVA, N.; VASILENKO, O.; FIRSOV, S.; SPIRINA, E.; GILICHINSKY, D. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 82, p. 501-509, 2012.
- 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.
- KOZLOVSKII, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V.; BASKUNOV, B. P.; KOCHKINA, G. A.; OZERSKAYA, S. M. Secondary metabolite profiles of the *Penicillium*

- fungi isolated from the arctic and antarctic permafrost as elements of polyphase taxonomy. *Microbiology*, v. 81, p. 306-311, 2012.
- KRISTJANSSON J.K & HREGGVIDSSON G.O. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 11, p. 17-25, 1995.
- 5 KROKEN, S.; GLASS, N. L.; TAYLOR, J.; YODER, O. C. Turgeon, B. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 15670-15675, 2003.
- 10 KUHLMAN, K. R.; VENKAT, P.; LA DUC, M. T.; KUHLMAN, G. M.; MCKAY, C. P. Evidence of a microbial community associated with rock varnish at Yungay, Atacama Desert, Chile. *Journal of Geophysical Research*, v. 113, 2008.
- LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian journal of microbiology*, v. 45, 172-177, 1999.
- 15 LAHAV, R.; FARELEIRA, P.; NEJIDAT, A.; ABELIOVICH, A. The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *Microbial ecology*, v. 43, p. 388-396, 2002.
- LI, J.; YU, L.; YANG, J.; DONG, L.; TIAN, B.; YU, Z.; LIANG, L.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHANG, K. New insights into the evolution of subtilisin-like serine protease genes in Pezizomycotina. *BMC evolutionary biology*, v. 10 p. 68, 2010.
- 20 LI, Y.; SUN B.; LIU, S.; JIANG, L.; LIU, X.; ZHANG H.; CHE, Y. Bioactive asterric acid derivatives from the Antarctic *Ascomycete* fungus *Geomyces* sp. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1643-1646, 2008.
- 25 LI, L.; LI, D.; LUAN, Y.; GU, Q.; ZHU, T. Cytotoxic Metabolites from the Antarctic Psychrophilic Fungus *Oidiodendron truncatum*. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 920-927, 2012.
- LIBKIND, D.; SOMMARUGAB, R.; ZAGARESEC, H.; VAN BROOCK, M. Mycosporines in carotenogenic yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, p. 749-754, 2005.
- 30 LIBKIND, D.; MOLINÉ, M.; SAMPAIO, J.P.; VON BROOCK, M. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiol Ecol*, v. 69, p. 353-362, 2009.
- LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T., Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. *Journal. Basic Microbiology*, v. 33, p. 413-426, 1993.
- LIMA, I. G. P. Novas perspectivas sobre a hipótese da panspermia. *Enciclopédia biosfera*, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 6, P. I-18, 2010.
- 35 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.
- 5 MAGAN N. Fungi in Extreme Environments. Environmental and Microbial Relationships, 2°  
edi., *The Micota IV*. Springer-Verlag, Berlin, p. 85-100, 2007.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 461-488, 2000.
- MALKUS, A.; CHANG, P. F. L.; ZUZGA, S. M.; CHUNG, K. R.; SHAO, J.; CUNFER, B. M.; ARSENIUK, E.; UENG, P. P. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second  
10 largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological research*, v. 110, 1152-1164, 2006.
- MCCREADY, S. J.; OSMAN, F.; YASUI, A. Repair of UV damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 451, p. 197-210, 2000.
- 15 MCKAY, C. P.; FRIEDMANN, E. I.; GÓMEZ-SILVA, B.; CÁCERES-VILLANUEVA, L.; ANDERSEN, D. T.; LANDHEIM, R. Temperature and Moisture Conditions for Life in the Extreme Arid Region of the Atacama Desert: Four Years of Observations Including the El Niño of 1997–1998. *Astrobiology*, v. 3, p. 393-406, 2003.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS.  
20 Análise e sugestão de Emendas à Resolução sobre parâmetros básicos para identificação e análise da vegetação primária e dos estágios sucessionais da vegetação secundária em campos de altitude associados ou abrangidos pela Mata Atlântica. 2008.
- MINNIS, A.M., LINDNER, D.L. Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. Nov in bat hibernacula of  
25 eastern North America. *Fungal Biology*, v. 117, p. 638-649, 2013.
- MOLINÉ, M.; FLORES, M. R.; LIBKIND, D.; DEL CARMEN DIÉGUEZ, M.; FARÍAS, M. E.; VAN BROOCK, M. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 9, p. 1145-1151, 2010.
- 30 MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*, v. 83, p. 757-766, 1991.
- MOORE, M. M.; BREEDVELD, M. W.; AUTOR, A. P. The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. *Arch Biochem  
35 Biophys*, v. 270 p. 419-431, 1989.

- MOTA, R. C. *Orchidaceae* na Serra do Caraça, Minas Gerais: Levantamento florístico com ênfase no estudo taxonômico da subfamília *Epidendroideae*. Departamento de Botânica da UFMG, 2006, 310p. (Dissertação de mestrado)
- 5 NCCLS, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A2. (2002) National Committee on Clinical Laboratory Standards 22: 15, 2002.
- 10 NCCLS – National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, second ed., NCCLS Document M 38-A, vol. 22, No. 16. NCCLS, Wayne, PA, p. 1-29, 2002.
- NCCLS, Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; Tentative Standard; approved standard, M24-A. National Committee on Clinical Laboratory Standards 23: 18, 2003.
- 15 NCCLS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, Seventh Edition M7-A7. National Committee on Clinical Laboratory Standards 26: 2, 2006.
- NILSSON, R. H.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K.; KVIST, E. S.; KRISTIANSSON, E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol Lett*, v. 296, p. 97-101, 2009.
- 20 NORTHUP, D. E.; SNIDER, J. R.; SPILDE, M. N.; PORTER, M. L.; VAN DE KAMP J. L.; BOSTON, P. J.; NYBERG, A. M.; BARGAR, J. R. Diversity of rock varnish bacterial communities from Black Canyon, New Mexico. *Journal of Geophysical Research*, v. 115, 2010.
- OARGA A. Life in extreme environments. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 9, p. 1-25 10, 2009.
- ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; PAGANO, S. Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planetary and Space Science*, v. 52, p. 229 - 237, 2004.
- ONOFRI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ISOLA, D.; RABBOW, E.; HORNECK, G.; DE VERA, J. P. P.; HATTON, J.; ZUCCONI, L. Resistance of Antarctic black fungi and 30 cryptoendolithic communities to simulated space and Martian conditions. *Studies in Mycology*, v. 99, p. 99-109, 2008.
- ORDOÑEZ, O. F.; FLORES, M. R.; DIB, J. R.; PAZ, A.; FARÍAS, M. E. Extremophile culture collection from Andean lakes: extreme pristine environments that host a wide diversity of 35 microorganisms with tolerance to UV radiation. *Microbial ecology*, v. 58, p. 461-473, 2009.
- ORTIZ, R.; NAVARRETE, H.; NAVARRETE, J.; PÁRRAGA, M.; CARRASCO, I.; DE LA VEGA, E.; ORTIZ, M.; HERRERA, P.; BLANCHETTE, R. A. Deterioration, decay and

- identification of fungi isolated from wooden structures at the Humberstone and Santa Laura saltpeter works: A world heritage site in Chile. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 86, p. 309-316, 2014.
- 5 PASCUAL, S.; MELGAREJO, P.; MAGAN, N. Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum*. *Mycopathologia*, v. 156, p. 93-100, 2002.
- PAULINO-LIMA, I. G.; JANOT-PACHECO, E.; GALANTE, D.; COCKELL, C.; OLSSON-FRANCIS, K.; BRUCATO, J. R.; BARTTA, G.A.; STRAZZULLA, G.; MERRIGAN, T. MCCULLOUGH, R.; MASON, N.; LAGE, C. Survival of *Deinococcus radiodurans* against laboratory-simulated solar wind charged particles. *Astrobiology*, v. 11p. 875-882, 10 2011.
- PAULINO-LIMA, I. G., AZUA-BUSTOS, A., VICUÑA, R., GONZÁLEZ-SILVA, C., SALAS, L., TEIXEIRA, L.; ROSADO, A.; LEITÃO, A. A. C.; LAGE, C. Isolation of UVC-tolerant bacteria from the Hyperarid Atacama Desert, Chile. *Microbial ecology*, v. 65, p. 325-335, 15 2013.
- 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.
- POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A Review Science against microbial pathogens: communicating current research and technological 20 advances. Méndez-Vilas (Ed.) 61-71, 2011.
- PRIEUR D. An Extreme Environment on Earth: Deep-Sea Hydrothermal Vents Lessons for Exploration of Mars and Europa. In: Grgaud M. *et al* (Eds), *Lectures in Astrobiology, Advances in Astrobiology and Biogeophysics*, v. 2, p. 319-345, 2007.
- 25 PULSCHEN, A. A.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R. T. D.; ARAUJO, G. G.; SANTIAGO, I. F.; PAULINO-LIMA, I. G.; ROSA, C. A.; KATO, M. J.; PELLIZARI, V. H.; GALANTE, D. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology , *Microbiology Open*, 2015.
- QUAEDVLIEG, W.; BINDER, M.; GROENEWALD, J. Z.; SUMMERELL, B. A.; CARNEGIE, A. J.; BURGESS, T. I.; CROUS, P. W. Introducing the Consolidated Species Concept to 30 resolve species in the Teratosphaeriaceae. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 33, p. 1-40, (2014).
- QUANG, D.N.; HASHIMOTO, T.; STADLER, M.; RADULOVIC, N.; ASAKAWA, Y. Antimicrobial azaphilones from the fungus *Hypoxylon multifforme*. *Planta Medica*, v. 71, p. 1058-1062, 2005.
- 35 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.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, v. 151, p. 341-353, 2001.
- 5 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.
- 10 ROTHSCHILD, L. J. & MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. *Nature*, v. 409, p. 1092-1101, 2001.
- 15 RUIBAL, C.; PLATAS, G.; BILLS, G. F. High diversity and morphological convergence among melanised fungi from rock formations in the Central Mountain System of Spain. *Persoonia*, v. 21, p. 93-110, 2008.
- 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.
- 20 RYAN, G.S.; HARPER, D. A. T.; WHALLEY, J. S. PALSTAT, Statistics for palaeontologist. *Chapman & Hall*, London, 1995.
- SAFFORD, H. D. & MARTINELLI, G. Southeast Brazil. In: Inselbergs: Biotic diversity of isolated rock outcrops in Tropical and Temperate regions. Alemanha: *Springer*, p. 339-389, 2000.
- 25 SALEEM, M.; NAZIR, M.; AKHTAR, N.; ONOCHA, P. A.; RIAZ, N.; JABBAR, A.; SHAIQ ALI, M. New phthalates from *Phyllanthus muellerianus* (Euphorbiaceae). *Asian Journal of Natural Products Research*, v. 11, p. 974-977, 2009.
- SATYANARAYANA, T.; RAGHUKUMAR, C.; SHIVAJI, S. Special section: microbial diversity current science, v. 89. *Extremophilic microbes: Diversity and perspectives*, 30 2005.
- SCHMIDT, S. K.; NAFF, C. S.; LYNCH, R. C. Fungal communities at the edge: Ecological lessons from high alpine fungi. *Fungal Ecology*, v. 5, p. 443-452, 2012.
- SCHROEDER, W .A. & JOHNSON, E. A. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* v. 139, p. 907-912, 1993.
- 35 SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Res Microbiol* v. 153, p. 585-592, 2002.

- 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.
- 5 SERT, H. B.; SÜMBÜ, H.; STERFLINGER, K. Microcolonial fungi from antique marbles in Perge/Side/Termessos (Antalya/Turkey). *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 91, p. 217-227, 2007.
- 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.
- 10 SINGARAVELAN, N.; GRISHKAN, I.; BEHARAV, A.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; NEVO, E. Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at "Evolution Canyon", Mount Carmel, Israel. *PLoS One*, v. 3, p. 2993, 2008.
- SINGH, S. M.; PUJA, G.; BHAT, D. J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. *Current Science*, v. 90, p. 1388-1392, 2006.
- 15 SMITH, D.J. Microbes in the Upper Atmosphere and Unique Opportunities for Astrobiology Research. *Astrobiology*, v.13, p. 981-990, 2013.
- STALEY, J. T.; PALMER, F. E.; ADAMS, J. B. Microcolonial fungi: Common inhabitants on desert rocks? *Science*, v. 215, p. 1093-1095, 1982.
- STERFLINGER, K. & KRUMBEIN, W. E. Multiple stress factors affecting growth of rock-inhabiting fungi. *Botanica Acta*, v. 108, p. 490-496, 1995.
- 20 STERFLINGER, K. & KRUMBEIN, W. E. Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiology Journal*, v. 14, p. 219-230, 1997.
- STERFLINGER, K. Temperature and NaCl-tolerance of rock inhabiting meristematic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 74, p. 271-281, 1998.
- 25 STERFLINGER, K.; DE HOOG, G. S.; HAASE, G. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in Mycology*, v. 43, p. 5-22, 1999.
- STERFLINGER, K. Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal*, v. 17, p. 97-124, 2000
- 30 STERFLINGER, K. & PRILLINGER, H. Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.80, p. 275-286, 2001.
- STERFLINGER, K.; TESEI, D.; ZAKHAROVA, K. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecology*, p. 1-10, 2012.
- 35 STORRIE-LOMBARDI, M. C. & SATTLER, B. Laser-Induced Fluorescence Emission (L.I.F.E.): In Situ Nondestructive Detection of Microbial Life in the Ice Covers of Antarctic Lakes. *Astrobiology*, v. 9, p. 659-673, 2009.

- STROBEL, G.; YANG, X. S.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis* microspora of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, v. 142, p. 435-440, 1996.
- STROBEL, G. A.; TORCZYNSKI, R.; BOLLON, A. *Acremonium* sp. - a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*, v. 128, p. 97-108 1997.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- 10 TANG, L. I.; LING, A. P.; KOH, R. Y.; CHYE, S. M.; VOON, K. G. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complem Altern Med*, v. 12, p. 3, 2012.
- 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*, 15 v. 4, p. 989-1001, 2010.
- TEJESVI, M. V.; NALINI, M. S.; MAHESH, B.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SHETTY, H. S.; SUBBIAH, V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Bol Soc Quím de Méx*, v. 1, p. 19-26, 2007.
- 20 TSUJI, M.; FUJII, S.; XIAO, N.; HANADA, Y.; KUDOH, S.; KONDO, H.; TSUDA, S.; HOSHINO, T. Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. *FEMS microbiology letters*, v. 346, p. 121-130, 2013.
- UNTEREINER, W.A. & MALLOCH, D. Patterns of substrate utilization in species of *Capronia* and allied black yeasts: ecological and taxonomic implications. *Mycologia*, v. 91, p. 417-427, 1999.
- 25 URZÍ, C.; KRUMBEIN, W. E.; CRISEO, G.; GORBUSHINA, A. A.; WOLLENZIEN, U. Are colour changes of rocks caused by climate, pollution, biological growth or by interactions of the three? 21 Proceedings of the International RILEM/ UNESCO. *Congress on the Conservation of Stone and other Materials*, v.1, p. 279-286, 1993.
- 30 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, p. 769-772, 2005.
- 35 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.
- 5 VERA, J-P.; MÖHLMANN, D.; BUTINA, F.; LOREK, A.; WERNECK, R.; OTT, S. Survival Potential and Photosynthetic Activity of Lichens Under Mars-Like Conditions: A Laboratory Study. *Astrobiology*, v. 10, p. 215-227, 2010.
- VERKLEY, G. J. M.; DUKIK, K.; RENFURM, R.; GÖKER, M.; STIELOW, J. B. Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32, 25, 2014.
- 10 VIEIRA, R. & SIMÕES, J. C. Geomorfologia glacial dos montes Patriot e montes Independence, montanhas Ellsworth, Manto de gelo da antártica ocidental. *Revista Brasileira de Geomorfologia*, v.12, n.1, p.45-58, 2011.
- VIEIRA, R.; HINATA, S.; DA ROSA, K. K.; ZILBERSTEIN, S.; SIMOES, J. C. Periglacial features in Patriot Hills, Ellsworth Mountains, Antarctica. *Geomorphology*, v. 155-156 p. 96-101, 2012.
- 15 VIEIRA, M. L.; JOHANN, S.; HUGHES, F. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. *Canadian journal of microbiology*, v. 60 p. 847-856, 2014.
- 20 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.
- 25 WAINWRIGHT, M. Oligotrophic growth of fungi: stress or natural state? In: Jennings, D.H. (Ed) *Stress Tolerance of Fungi*. Marcel Decker, New York, 1993.
- WASKIEWICZ, A.; GOLINSKI, P.; KAROLEWSKI, Z.; IRZYKOWSKA, L.; BOCIANOWSKI, J.; KOSTECKI, M.; WEBER, Z. Formation of fumonisins and other secondary metabolites by *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*: a comparative study. *Food Additives and Contaminants*, v. 27, p. 608-615, 2010.
- 30 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.
- 35 WILSON, Z. E. & BRIMBLE, M. A. Molecules derived from the extremes of life. *Natural Product Report*, v. 26, p. 1-140, 2009.

- WOLFE-SIMON F.; BLUM, J. S.; KULP, T. R.; GORDON G. W.; HOEFT, S. E.; PETT-  
RIDGE, J.; STOLZ, J.F.; WEBB, S. M.; WEBER, P. K.; DAVIES, P. C. W.; ANBAR, A.  
D.; OREMLAND, R. S. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of  
Phosphorus. *Science*, p. 1-6, 2010.
- 5 WOLLENZIEN, U.; DE HOOG, G. S.; KRUMBEIN, W.E.; URZÍ, C. On the isolation of  
microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Science of the  
Total Environment*, v. 167, p. 287- 294, 1995.
- WU, G.; MA, H.; ZHU, T.; LI, J.; GU, Q.; LI, D. Penilactones A and B, two novel polyketides  
from Antarctic deep-sea derived fungus *Penicillium crustosum* PRB-2. *Tetrahedron*, v. 68  
10 p. 9745-9749, 2012.
- WYNN-WILLIAMS, D. D. & EDWARDS, H. G. M. Environmental-UV radiation; biological  
strategies for protection and avoidance in Astrobiology; the quest for the conditions of life,  
(eds) Berlin: Horneck, G. and Baumstark-Khan, C., *Springer-Verlag*, pp.245- 260, 2002.
- YANG, S. S.; WANG, G. J.; CHENG, K. F.; CHEN, C. H.; JU, Y. M.; TSAU, Y. J.; LEE, T. H.  
15 Bioactive  $\gamma$ -lactones from the fermented broth of *Neosartorya* sp. *Planta Medica*, v. 76, p.  
1701-1705, 2010.
- ZALAR, P.; DE HOOG, G.S.; SCHROERS, H.J.; CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.;  
GUNDE-CIMERMAN, N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium  
sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline  
20 environments. *Studies in Mycology* v. 58: p. 157-183, 2007.
- ZUCCONI, L.; SELBMANN, L.; BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; GUGLIELMIN, M.; FRISVAD,  
J. C.; ONOFRI, S. Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. *Polar  
Biology*, v. 35, p. 749 - 757, 2012.

## 25 **9. Atividades desenvolvidas no período**

**I Simpósio de Microbiologia da UFMG**, a Microbiologia e a Sociedade, realizado no  
período de 01 a 02 de setembro de 2014, Belo Horizonte, Brasil.

- 30 **Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy**, realizado no período de 02  
a 06 de agosto de 2014 em Oxford, EUA. Apresentação de Poster: Bioprospection of rock-  
inhabiting fungi from extreme environments. Gonçalves, V.N; Cantrell, C.L; David, W.; Jacob  
M.; Khan, S.; Alves, T.M.A.; Zani, C.L.; Galante, D.; Rodrigues, F.; Schaefer, C.; Rosa, C.;  
Rosa, L.



**II Encontro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Criosfera**, realizado em 2013, em Bento Gonçalves, Brasil. Apresentação oral: Fungi associated with rocks of extreme ecosystems: taxonomy, diversity, bioprospecting and use in studies of astrobiology.

5 Gonçalves VN, Alves TMA, Zani CL, Galante D, Rodrigues F, Pacheco EJ, Kato MJ, Yamaguchi L, Gomez B, Schaefer CEGR, Cantrell C, Wedge DE, Rosa CA, Rosa LH.

**SPASA - Sao Paulo Advanced School of Astrobiology**, realizado no período de 11 a 20 de dezembro de 2011 em São Paulo, SP. Apresentação de pôster: Fungi associated with rocks of extreme ecosystems: taxonomy, diversity, bioprospecting applications and use as models in the study of astrobiology. Gonçalves, V.N.; Alves, T.M.A.; Zani, C.L.; Rabello, A.; Galante, D.; Rodrigues, F.; Rosa, C.A., Rosa, L.H.

15 **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, realizado no período de 02 a 06 de outubro de 2011 em Foz do Iguaçu, Paraná. Apresentação de poster: Diversidade e Bioprospecção de fungos presentes em lagos antárticos. Gonçalves, V.N., Vaz, A.B.M., Carvalho, C.R.; Pereira C.B.; Alves T.M.A.; Zani C.L.; Rabello, A.; Johann, S.; Cisalpino, P. S.; Rosa, C.A., Rosa, L.H.

## 20 **10. Produção científica**

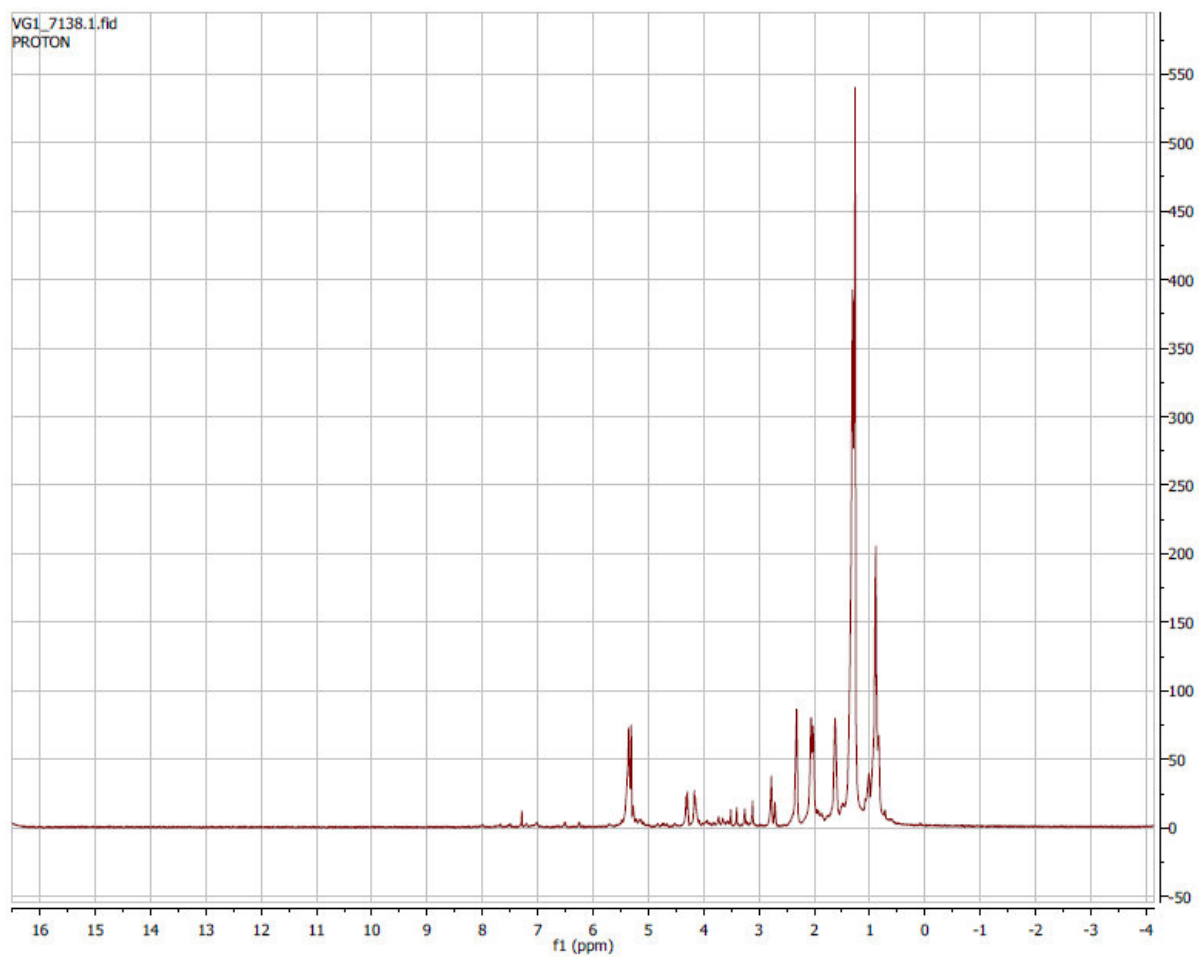
GODINHO, V. M.; **GONÇALVES, V. N.**; SANTIAGO, I. F.; FIGUEREDO, H. M.; VITORELI, G. A.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J. G.; ALVES, T. M. A; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; 25 KROON, E. G.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; DUKE, S. O.; ALI, A.; ROSA, C. A; ROSA, L. H. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, p. 1-12, 2015.

**GONÇALVES, V. N.**, CARVALHO, C. R., JOHANN, S., MENDES, G., ALVES, T. M., 30 ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; CANTRELL, C. L; ROSA, C. A.; Rosa, L. H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, p. 1-10, 2015.

- BEZERRA, R. J.; BEZERRA, R. J. S.; ALVEZ, L. A.; FRUTUOSO, V. S.; FERREIRA, N. C. S.; SOUZA, C. Z.; CALHEIROS, A. S.; AZEREDO, J. A.; ALVES, T. M. A.; FRANCISCO, F. L. M.; ROSA, C. A.; FURBINO, L. E.; **GONÇALVES, V.N.**; BRANDAO, L. R.; ROSA L.H. Atividade antagonista do extrato do fungo *Metschnikowia australis* sobre os receptores P2X7 e uso desse extrato no tratamento de doenças relacionadas ao receptor P2X7. 2014, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR102014030890, data de depósito: 10/12/2014, título: "Atividade antagonista do extrato do fungo *Metschnikowia australis* sobre os receptores P2X7 e uso desse extrato no tratamento de doenças relacionadas ao receptor P2X7" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- 10 **GONÇALVES, V. N.**; CAMPOS, L. S.; MELO, I. S.; PELLIZARI, V. H.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. *Polar biology*, v. 36, p. 1823-1831, 2013.
- 15 **GONÇALVES, V. N.**; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecology*, p. 1-13, 2012.
- 20 CARVALHO, C. R.; **GONÇALVES, V. N.**; PEREIRA, C. B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I. V.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M.E.G.; ZANI, C. L.; ROSA, C.A.; ROSA, L. H. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, v. 57, 2012.

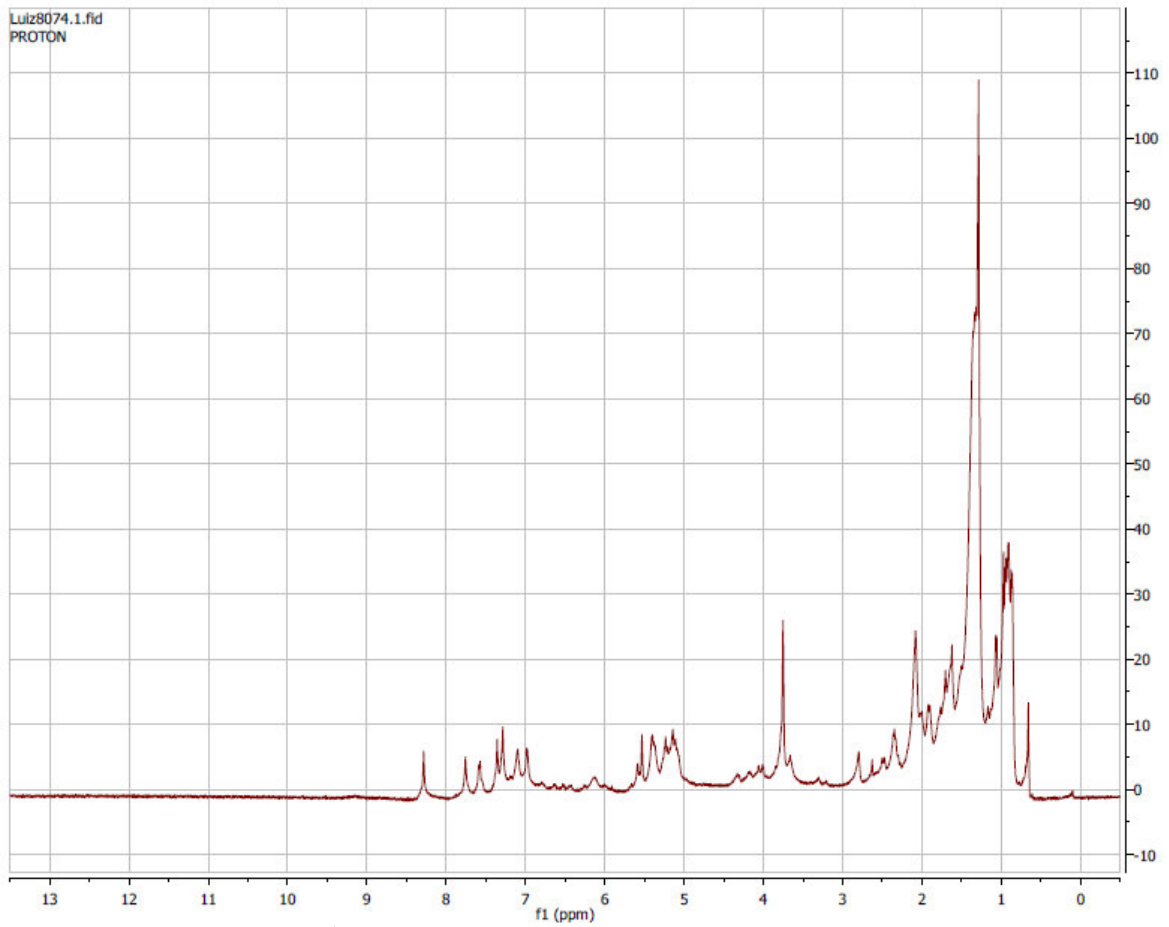
## 11. Anexos

### Anexo a



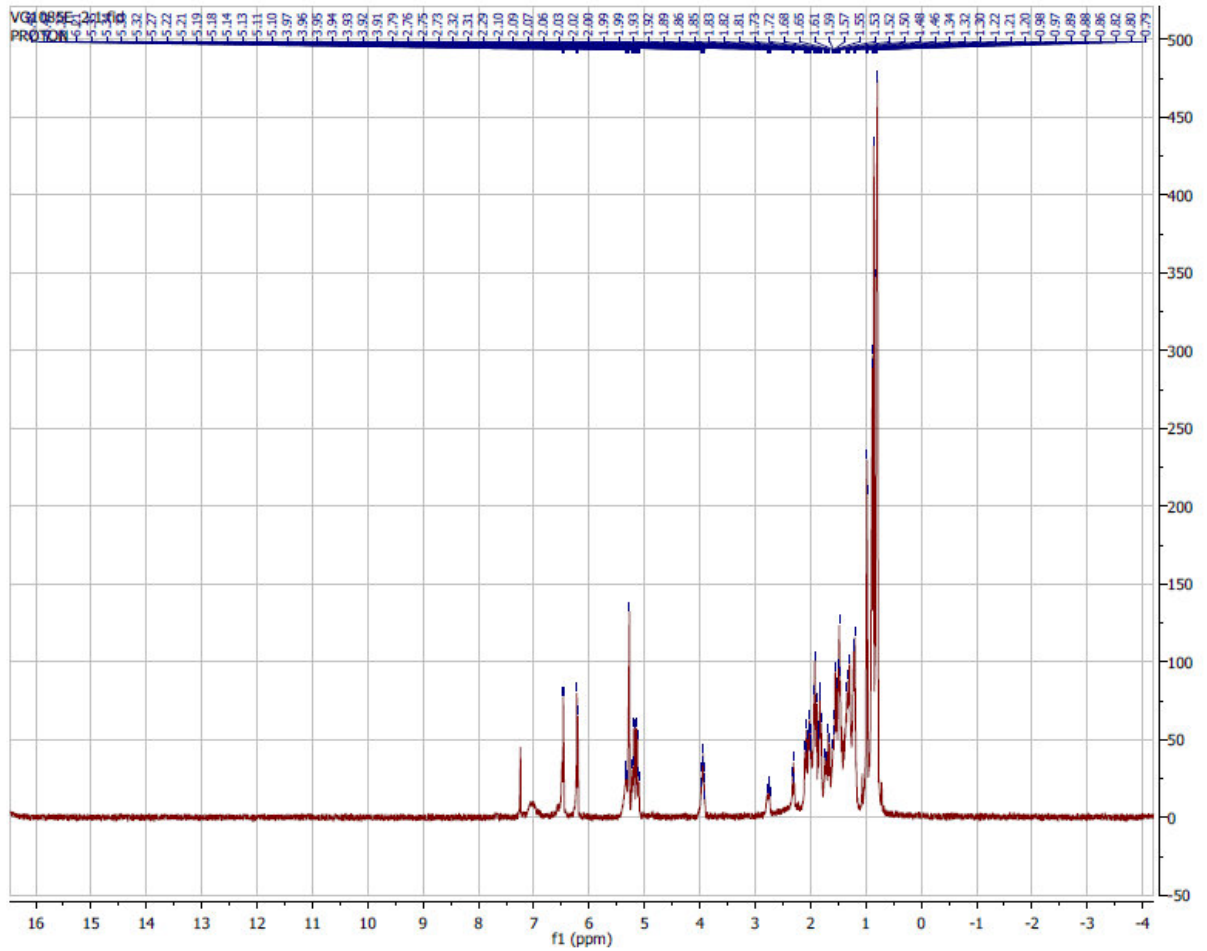
5 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do extrato do fungo *Acremonium* sp. UFMGCB 7138.

## Anexo b

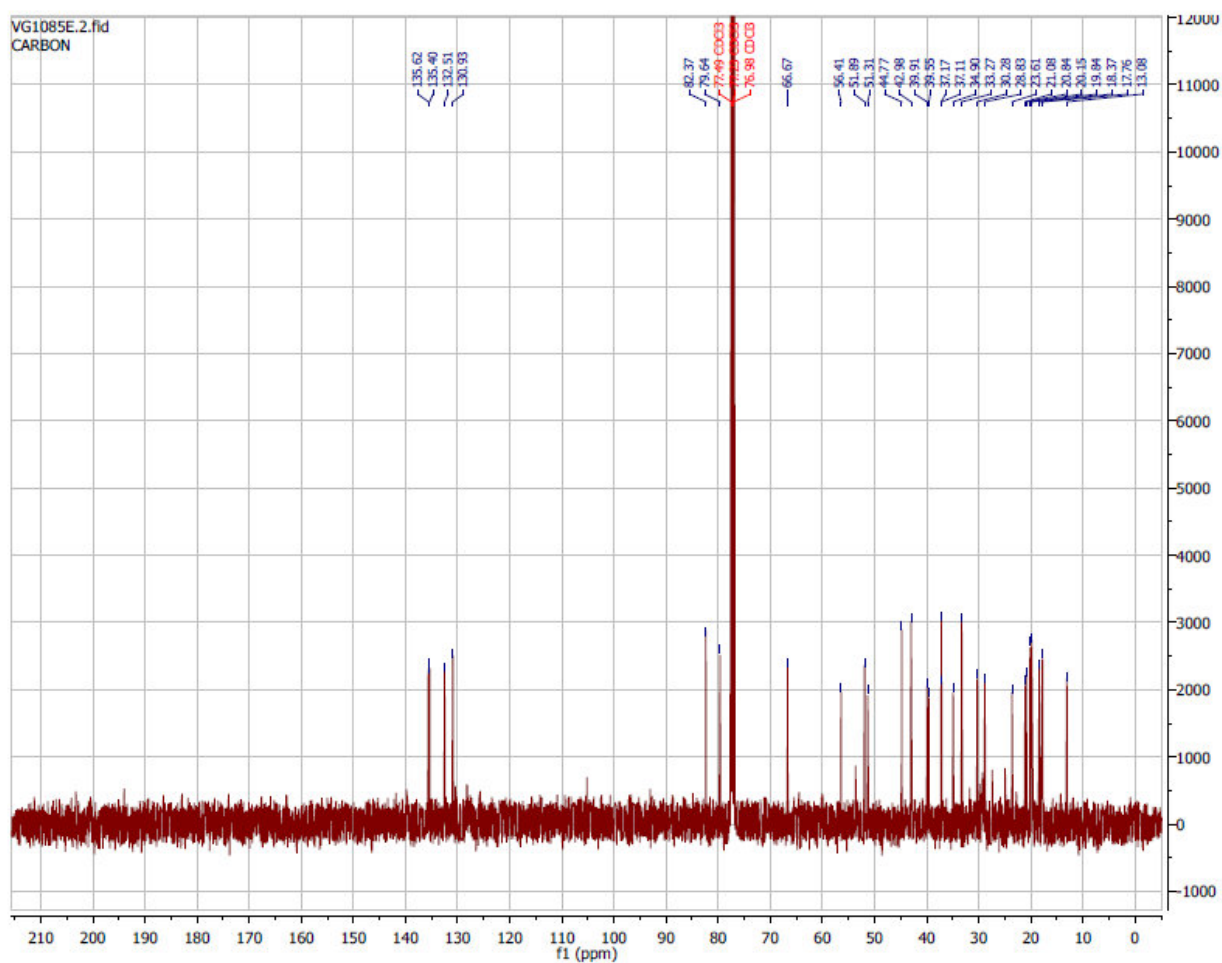


Espectro de RMN <sup>1</sup>H do extrato do fungo *P. chrysogenum* UFMGCB 8074.

### Anexo c

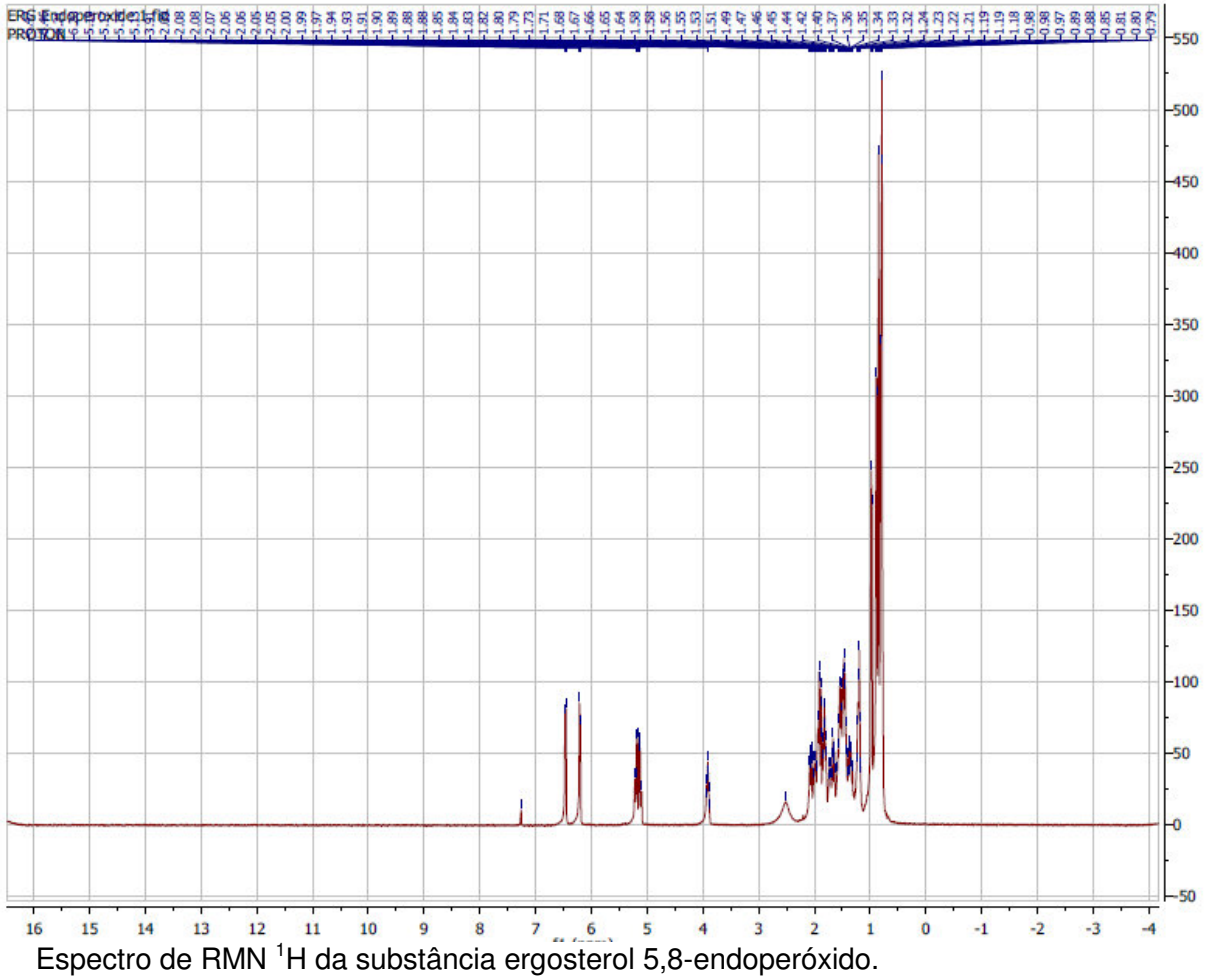


## Anexo d

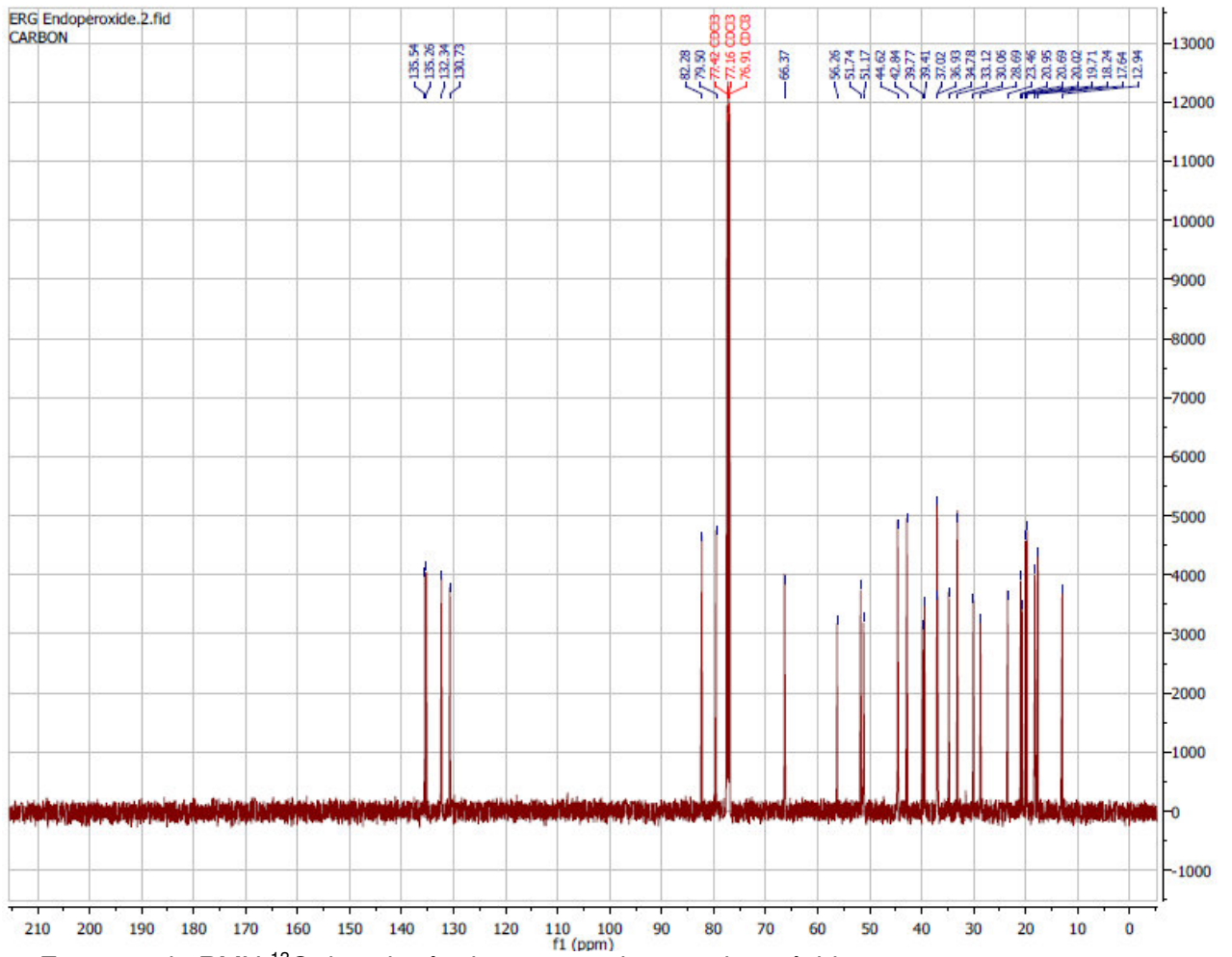


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do fração E do extrato do fungo *P. chrysogenum* UFMGCB 8074.

# Anexo e



# Anexo f



Espectro de RMN <sup>13</sup>C da substância ergosterol 5,8-endoperoxido.

5

10