



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

**RUAN MATHEUS FREITAS DE CASTRO**

**Análise da viabilidade, termoresistência e potencial enzimático de  
Aspergillus spp. da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade  
do Estado do Amazonas**

MANAUS

2023

**RUAN MATHEUS FREITAS DE CASTRO**

**Análise da viabilidade, termoresistência e potencial enzimático de  
Aspergillus spp. da Central de Coleções Microbiológicas da  
Universidade do Estado do Amazonas**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, como componente curricular obrigatório para obtenção do título de Graduação Bacharel em Enfermagem da Universidade do estado do Amazonas-UEA.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Suanni Lemos de Andrade

MANAUS

2023

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

R894aa Castro, Rua Matheus Freitas de Castro  
Análise da viabilidade, termoresistência e potencial enzimático de *Aspergillus* spp. da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas / Rua Matheus Freitas de Castro Castro. Manaus : [s.n], 2023.  
21 f.: il.; 30 cm.

TCC - Graduação em Enfermagem - Bacharelado - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Suanni Lemos de Andrade

1. Fungos filamentosos. 2. Virulência. 3. *Aspergillus*.. I. Suanni Lemos de Andrade (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Análise da viabilidade, termoresistência e potencial enzimático de *Aspergillus* spp. da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas

## **Sumário**

1. Introdução.....	5
2. Meios e Métodos .....	7
2.1 Obtenção e reativação das cepas fúngicas .....	7
2.2 Viabilidade e Bioensaios .....	7
3. Resultados .....	8
4. Discussão.....	11
5. Conclusão .....	13
6. Referências .....	14

**Análise da viabilidade, termoresistência e potencial enzimático de *Aspergillus* spp. da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas**

Ruan Matheus Freitas de Castro<sup>1</sup>

Suanni Lemos de Andrade<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Discente do Curso de Enfermagem da Universidade do Estado Do Amazonas. Bolsista FAPEAM- Email: [rmfdc.enf18@uea.edu.br](mailto:rmfdc.enf18@uea.edu.br)

<sup>2</sup> Doutora em Ciências Biológicas. Professora de Carreira da Universidade do Estado Do Amazonas. Email: [slandrade@uea.edu.br](mailto:slandrade@uea.edu.br)

**RESUMO**

**Introdução:** Coleções de cultura são infraestruturas que comportam organismos ou parte deles, com conservações possíveis de curto, médio e longo prazo, permitindo estudos retrospectivos e prospectivos, quanto à biologia, etiologia e aspectos de virulência dos fungos. **Objetivos:** Esta pesquisa teve como objetivo analisar a viabilidade, termoresistência e potencial enzimático de *Aspergillus* ssp. depositados na Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM-UEA). **Meios e Métodos:** Trata-se de uma pesquisa experimental desenvolvida na CCM-UEA, verificada viabilidade fúngica através de características macro e microscópicas como também realizados ensaios térmicos e enzimáticos. **Resultados:** Das 18 culturas de origem ambiental 100% foram viáveis, tendo armazenamento de 16, 13 e 12 anos. Nos Bioensaios térmicos de 37°C, 40°C e 45°C, foram positivas 67% das cepas a 37°C e 56% em 40°C no período de 72h. Nos Bioensaios enzimáticos 55 % das cepas positivaram para proteinases e 11% para fosfolipases. **Conclusão:** Fungos Amazônicos do gênero *Aspergillus*, com conservação por períodos superiores a 10 anos permanecem viáveis para manuseio laboratorial, sendo termotolerantes e produtores enzimáticos de proteinases e fosfolipases, sinalizando uma via de indução para patogenia.

**Palavras-Chave:** Fungos filamentosos, Virulência, *Aspergillus*.

**Key words:** Filamentous fungi, Virulence, *Aspergillus*.

## Introdução

O conhecimento de toda diversidade de fungos em seus habitats naturais ainda é limitado, o que torna necessário estocá-los para uso na posteridade, conservando os aspectos químicos, genéticos e morfofisiológicos, refletindo no incentivo ao desenvolvimento de linhas de pesquisas micológicas em vários países <sup>(1-4)</sup>. Desse modo, fungos, devidamente organizados, documentados e guardados no método de conservação adequado, esboçam grande valor para nosso mundo globalizado <sup>(5-8)</sup>.

A conservação de cepas fúngicas dispõe de uma variedade de opções, visto que não há uma técnica generalizada capaz de conserva-las adequadamente <sup>(9-10)</sup>. Dentro dos estudos existem as análises das melhores técnicas a serem empregadas e da disponibilidade de recursos locais, assim a escolha deve ser baseada nas características dos microrganismos, vantagens e desvantagens, considerando local e técnica <sup>(11-13)</sup>.

No ano de 1729, Padre Micheli, que na época era também micologista, fez a descrição do gênero fúngico *Aspergillus*, que recebeu esse nome pela semelhança ao *Aspergillum* “instrumento litúrgico” <sup>(14)</sup>. Ao longo da história o gênero foi explorado e se conhecem cerca de mais de 200 espécies <sup>(15)</sup>, das quais 180 são denominadas anamórficas, divididas em seções, tem uma taxonomia ampla e complexa, com necessidade de constantes estudos para evolução no que tange a identificação, correção de espécies descritas erroneamente, potencial biotecnológico e médico <sup>(16)</sup>.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são amplamente distribuídos, e têm papéis importantes diretamente relacionados à vida do homem, como o grande potencial biotecnológico a partir da produção de metabólitos secundários, alguns deles conhecidos como enzimas, que podem se influenciar pelas condições de temperatura <sup>(17)</sup>. Quando preservados em coleções permitem a análise das atividades de virulência através de bioensaios, como termoresistência e produção de fosfolipases e proteinases as quais podem

inferir virulência <sup>(18)</sup>. O levantamento de dados como estes são necessários para fortalecer os alicerces de conhecimento dentro da micologia médica <sup>(19)</sup>.

As espécies de *Aspergillus* de interesse médico estão em constante exploração ao longo dos anos, apesar dos avanços a enfermidade causada por fungos desse gênero ainda é um problema de saúde em determinados grupos de risco <sup>(20)</sup>. Há um amplo espectro de doenças em humanos causadas por espécies de *Aspergillus*, influenciadas na maioria das vezes pelo estado imunológico subjacente do hospedeiro com diagnóstico geralmente tardio e letal <sup>(21)</sup>.

Desta forma, o estudo de microrganismos estocados previamente em coleções dão margem para exploração *in vitro* de todos os seus potenciais, possibilitando abastecimento do banco de dados de coleções de cultura fúngica. Dados que podem refletir no entendimento das características de invasão e adaptação do patógeno ao hospedeiro <sup>(22)</sup>.

Esta pesquisa teve como objetivo analisar a viabilidade, termoresistência e potencial enzimático de *Aspergillus* spp. depositados na sub-coleção da Universidade do Estado do Amazonas. A relevância deste trabalho para o Estado permiti fortalecer o conhecimento dos microrganismos da Amazônia para subsidiar estudos futuros dentro da micologia médica, tendo em vista seu valor na comunidade científica.

## Meios e Métodos

Trata-se de uma pesquisa experimental com linhagens fúngicas do gênero *Aspergillus* da sub-coleção dos Programas de Pós-graduação. Realizados ensaios térmicos e enzimáticos, a fim de verificar potencial termorresistente e poder patogênico dos fungos.

A pesquisa foi desenvolvida na sub-coleção, no laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais – (PPG-MBT), localizado na Escola Superior de Ciências da Saúde, da Universidade do Estado do Amazonas – (ESA-UEA).

**Obtenção e reativação das cepas fúngicas:** Foram obtidas 18 cepas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* estocados previamente em água destilada estéril, através da técnica de Castellani <sup>(23)</sup>, classificados como fungos de origem ambiental. Retirados fragmentos do micélio para serem transferidos para ágar batata dextrose (BDA) e mantidos em BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , por aproximadamente 7 dias, ou até o crescimento ideal, as culturas foram purificadas através de repiques sucessivos em diferentes repetições. A depender das exigências fisiológicas foi cogitado o uso de outros meios alternativos com cloranfenicol em caso de contaminação bacteriana.

**Viabilidade e Bioensaios:** A confirmação da viabilidade foi realizada através das características macroscópicas e microscópicas em técnica de microcutivo. Posteriormente, os isolados reativados foram submetidos aos ensaios realizados nas temperaturas de  $37^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$  em duplicata, os testes foram analisados de acordo com a medida do raio das colônias <sup>(24-25)</sup>.

Na sequência, analisados quanto à capacidade de produção enzimática para fosfolipases e proteinases, foram transferidos em meio BDA e após 72 horas iniciados os testes em meios de culturas específicos, em proteinase utilizou-se meio indutor contendo Ágar Leite e para fosfolipases o meio indutor Ágar Sabouraud acrescido de sais e gema de



ovo natural, ambos na busca de detectar a formação de um halo opaco em fosfolipases e transparente em proteinases, a atividade enzimática foi mensurada utilizando o valor da zona de precipitação (Pz) dado como a média dos diâmetros avaliados (colônia / halo + colônia) cuja classificação de acordo com o valor do Pz foi: atividade enzimática muito forte ++++ ( $Pz \leq 0,69$ ), forte +++ ( $Pz$  entre 0,70 – 0,79), média ++ ( $Pz$  entre 0,80 – 0,89) ou fraca + ( $Pz$  entre 0,90 – 0,99) <sup>(26)</sup>.

## Resultados

No presente estudo as 18 culturas de origem ambiental conforme (Quadro 1), 100%, mantiveram suas características macro e microscópicas puras, sendo cepas distribuídas nas idades de 12, 13 e 16 anos de conservação.

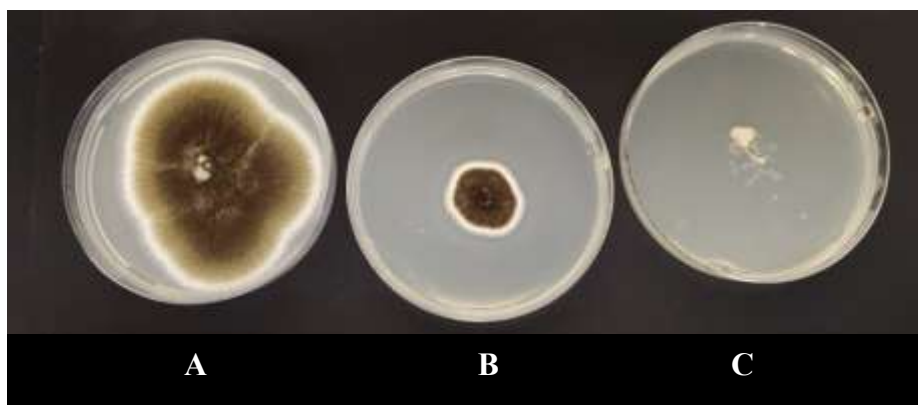
**Quadro 1:** Ano de preservação, origem, substrato e reativação

CCM-UEA	Ano de depósito/ Tempo de preservação	Classificação	Substrato	Planta de origem
10001	2007/16	Fitopatogênico	Semente	SI
10002	2007/16	Fitopatogênico	Fruto	SI
10005	2007/16	Degradador	Madeira	SI
10007	2007/16	Fitopatogênico	Fruto	SI
10014	2007/16	Fitopatogênico	Semente	SI
10025	2007/16	Fitopatogênico	Folha	SI
10026	2007/16	Fitopatogênico	Fruto	SI
10027	2007/16	Fitopatogênico	Semente	SI
10028	2007/16	Fitopatogênico	Fruto	SI
10038	2007/16	Endofítico	Folha	SI
10040	2007/16	Endofítico	Raíz	SI
10042	2010/13	Endofítico	Semente	SI
10236	2010/13	Endofítico	Madeira	AR
10292	2010/13	Endofítico	Madeira	AR
10296	2010/13	Endofítico	Folha	AN
10297	2010/13	Endofítico	Madeira	AR
10302	2010/13	Endofítico	Madeira	AR
10308	2011/12	Endofítico	Madeira	AR

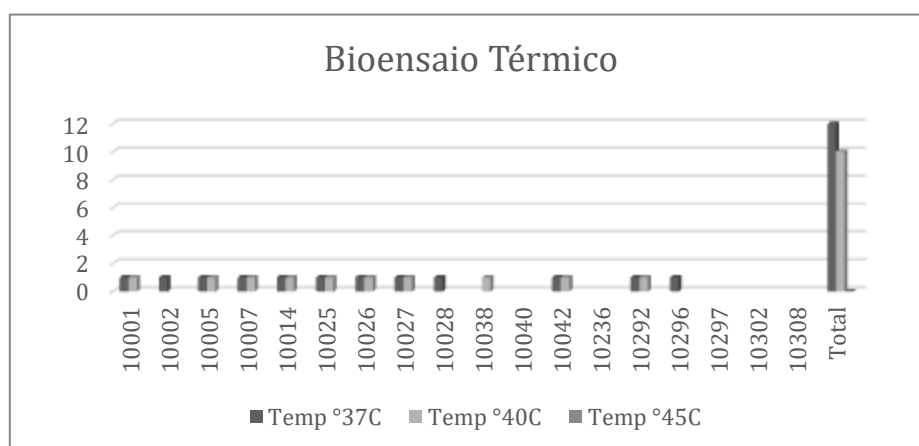
*Aspidosperma nitidum* (AR), *Aniba roseadora* (AN) e (SI) Sem identificação

Fonte: Arquivos CCM-UEA

Para o teste de crescimento nas temperaturas, os fungos incubados em 37°C, 40°C e 45°C (duplicata), analisados de acordo com a capacidade de crescimento nas respectivas condições térmicas, ficou evidente que os isolados apresentam termotolerância a temperaturas de 37°C 67% e 40°C 56% tendo crescimento satisfatório em 72h (Figura 1) (Gráfico 1).

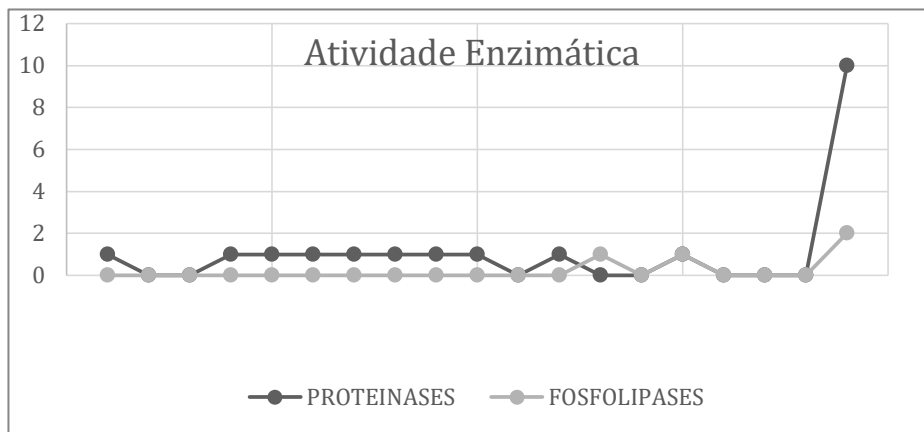


**Figura 1:** CCM-UEA 10042 A: Positivo a 37°C; B: Positivo a 40°C; C: Negativo a 45°C.

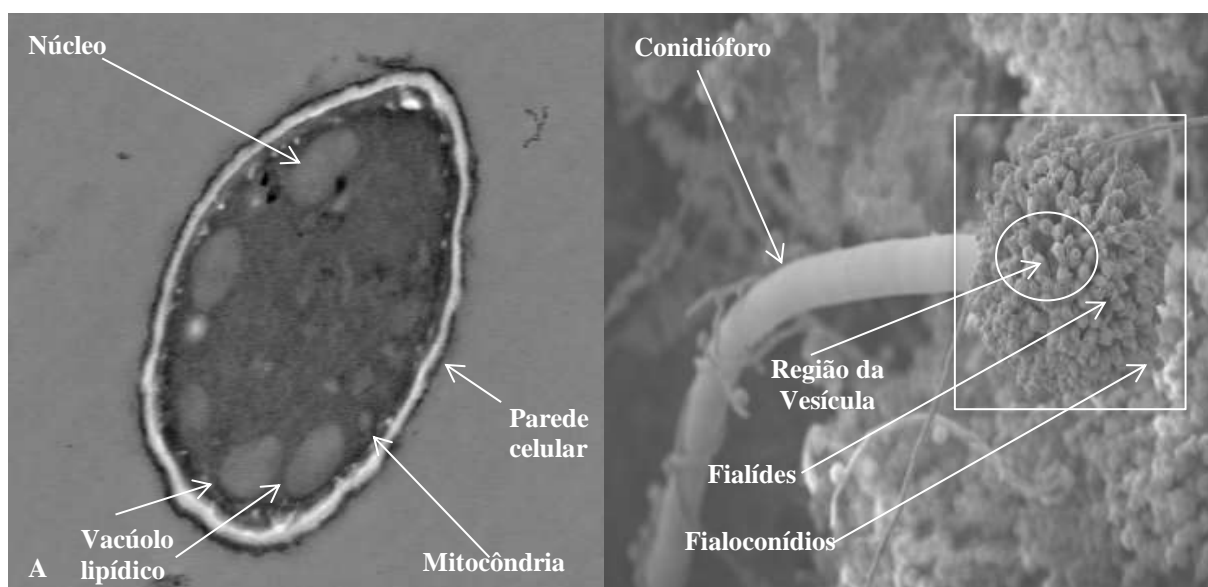


**Gráfico 1:** Relação de termotolerância de todos os isolado e temperaturas testadas.

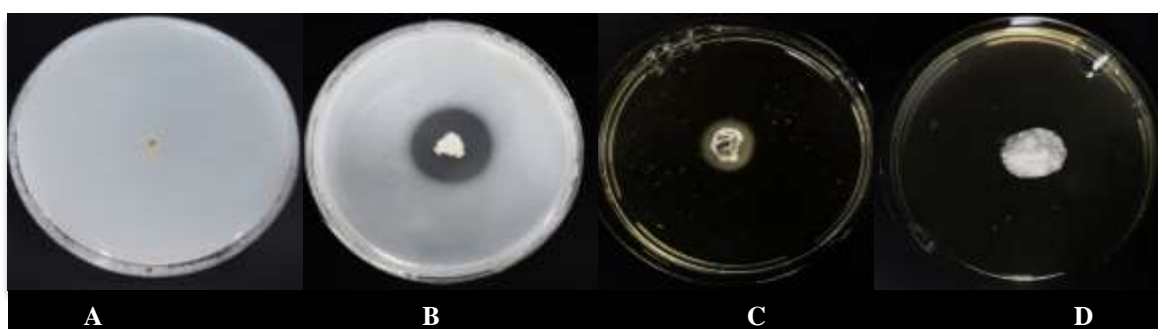
Quanto à atividade enzimática, em proteinases 55% das cepas foram positivas, enquanto em fosfolipases apenas 11% (Gráfico 2). O espécime CCM-UEA 10296 foi o único a expressar atividade nos dois meios, sendo assim selecionado para as técnicas de microscopia de transmissão e varredura (Figura 2), e o seu predomínio foi de atividade enzimática classificada como muito forte (Figura 3).



**Gráfico 2:** Biensaio enzimático proteinases (10) e fosfolipases (2).



**Figura 2:** CCM-UEA 10296, **A:** Microscopia de varredura com presença de conidióforo verrucoso, vesícula, fialídes e fialoconídios, demonstrando a viabilidade microscópica, **B:** Microscopia de transmissão, com visualização do esporo fúngico, demonstrando estruturas internas, parede celular vacúolo lipídico, mitocôndrias e núcleos.



**Figura 3:** CCM-UEA 10296 **A e B teste de proteinases.** Em **A:** Resultado positivo para proteinase com presença do halo transparente, **B:** Controle negativo para proteinase, **C e D teste de fosfolipases.** Em **C:** Resultado positivo para fosfolipases com presença de halo opaco, **D:** Controle negativo para fosfolipases.

## Discussão

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, com destaque para a região amazônica que detém grande diversidade microbiana, sobretudo de fungos, que ainda é pouco explorada<sup>(27)</sup>. Entretanto, para estudar e analisar os benefícios e malefícios causados por esses organismos é necessário a sua preservação e conservação para o futuro, em técnicas especializadas<sup>(28)</sup>.

Para o armazenamento em curto prazo é utilizado o repique contínuo, sendo este mais propenso a contaminações, já em médio prazo utiliza-se preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada e congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , nos métodos de longo prazo destacam-se liofilização e criopreservação<sup>(29)</sup>.

Estudos que buscaram analisar a conservação em água destilada estéril conseguiram comprovar a viabilidade e capacidade de esporulação dos isolados, além de fundamentar o fácil manuseio e armazenagem<sup>(30)</sup>. A exemplo disso tem-se estudos como os desenvolvidos na Micoteca URM, Brasil, onde das 79 culturas de dermatófitos preservados de 17 e 18 anos em água destilada esterilizada, apenas (49%) foram viáveis e mantiveram suas características morfológicas estáveis<sup>(31)</sup>. Os resultados, utilizando a mesma técnica de conservação, foram promissores em relação à viabilidade e tempo de estocagem, sobretudo levando em consideração a climatologia regional amazônica. As cepas conservadas na CCM-UEA com idade aproximada ao estudo anterior se mostram 100% viáveis e com suas características microscópicas mantidas.

Estes fungos podem ganhar grande valor se mantidos devidamente organizados e documentados, pois coleções como a CCM-UEA funcionam como uma arca de preservação de fungos com interesse médico e biotecnológico. O que reflete em recursos estratégicos de segurança nacional, que podem fazer parte da infraestrutura e inovação do Amazonas<sup>(32)</sup>.

Fungos do gênero *Aspergillus*, são tidos como microrganismos que apresentam facilidade para cultivo em laboratório, e os isolados deste gênero quando apresentam termotolerância, predominam crescimento positivo respectivamente à 37° e 40° C <sup>(33)</sup>. Nos bioensaios realizados nesta pesquisa os isolados do gênero *Aspergillus* demonstram crescimento completo e satisfatório em 72h a 37° e 40° C, confirmando assim sua termotolerância e facilidade de manipulação em ambiente laboratorial controlado.

O crescimento em temperaturas elevadas é de grande relevância na expressão enzimática e contribui para os fatores de virulência, sinalizando uma via de indução para patogenia <sup>(34)</sup>. No estudo que explorou a diversidade fúngica associada a diferentes altitudes de rochas no deserto do Atacama, observou características termoresistêntes em condições extremas, dentre os gêneros avaliados o gênero *Aspergillus*, apresentou boa desenvoltura <sup>(35)</sup>. O que indica que os isolados do gênero em questão neste trabalho possuem características termoresistêntes notáveis a serem testadas de forma mais profunda em ensaios térmicos posteriores.

Um bioensaio enzimático com fungos de origem amazônica testou cepas no período de 48 h de incubação, dos 10 exemplares apenas um não apresentou atividade proteolítica, tendo, portanto 90% dos fungos <sup>(36)</sup>. O índice de atividade proteolítica foi alto nos *Aspergillus* nesse estudo, sendo assim isso demonstra que fungos desse gênero, isolados no Estado do Amazonas são ótimos produtores de enzimas proteinases mesmo levando em consideração sua origem ambiental e conservação por períodos extensos.

A atividade fosfolipásica é presente preferencialmente em leveduras do gênero *Candida*, quando comparado ao gênero *Aspergillus* <sup>(37)</sup>. Desta forma com o baixo resultado de atividade enzimática para fosfolipases obtido com os fungos filamentosos selecionados sugere-se que este gênero é pouco produtor desta enzima, porém sua atividade não é nula.

Enzimas como as fosfolipases e proteinases, quando associadas a fatores como a pressão da hifa em áreas fragilizadas ou a inalação de conídios, permitem a instalação de infecções em humanos, evento este facilitado pelo estado imunológico subjacente do hospedeiro<sup>(38)</sup>. As fosfolipases desintegram camadas epiteliais facilitando a fixação da hifa no interior citoplasmático e as proteinases estão envolvidas na invasão tecidual por degradação maciça de proteínas, em especial as que participam de ações imunológicas<sup>(39)</sup>.

A queda da defesa imunitária com o declínio no funcionamento dos macrófagos alveolares somados a expressão enzimática e fatores como o número de propágulos fungicos na exposição, pactuam para o desenvolvimento da enfermidade de forma invasiva<sup>(40)</sup>. O conhecimento destes processos fortalecem os alicerces terapêuticos vinculados à exploração da biodiversidade fúngica, baseada na Micologia Médica.

Tendo em vista que a Aspergilose é uma doença geralmente negligenciada e pouco explorada na região Amazônica, a conservação de cepas ambientais com potencial virulento dão a oportunidade de realização de bioensaios controlados para exploração do comportamento dos fungos em diferentes condições, as quais possam simular seu comportamento como patógeno humano.

## **Conclusão**

Conclui-se que fungos Amazônicos do gênero *Aspergillus*, tem possibilidade de conservação por períodos extensos em técnicas pouco laboriosas e onerosas, sua manipulação em ambiente laboratorial é satisfatória, sendo um fungo de fácil manuseio e de bom crescimento em clima equatorial quente e úmido.

As cepas isoladas de substratos ambientais emanam potencial termotolerante que pode influenciar em suas ações enzimáticas, sobretudo para via de indução patogênica, o mecanismo de ação de destaque é o das proteinases, sendo as principais expressadas pelas cepas dessa região. As fosfolipases tem sua positividade baixa nas cepas amazônicas, porém

quando encontrada sua classificação de virulência é, sobretudo alta requerendo assim estudos mais profundos a cerca do seu perfil patogênico desses fungos.

A manipulação de cepas ambientais em ensaios que buscam identificar virulência é fundamental no seu entendimento, não havendo assim a constante necessidade de isolamentos clínicos para estudos, tornando possível conhecer o poder patogênico dos fungos antes mesmo da enfermidade ser instalada nos hospedeiros suscetíveis.

Percebe-se a importância das cepas amazônicas da CCM-UEA serem exploradas em diferentes estudos para o enriquecimento do seu banco de dados. Como o aprofundamento dos potenciais enzimáticos de diversas enzimas sejam elas de interesse médico ou industrial. Além de se ter a necessidade de aplicações em técnicas de biologia molecular, afim de construir suas arvores filogenéticas com possibilidade de chegada até suas espécies de fato.

## Referências

1. Kury A C, Aleixo A, Bonaldo A B, Marino A, Percequillo A, Prudente A L C. et al. Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), 2006. 324 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em:[https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/Livro+Biocomplexidade\\_4399.pdf/6ad794fb-f37e-4b16-985f-d79e986e89c2?version=1.2](https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/Livro+Biocomplexidade_4399.pdf/6ad794fb-f37e-4b16-985f-d79e986e89c2?version=1.2)
2. José S C B R.. Recursos Genéticos: O produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa, 2019. (1): 304 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1111833/recursos-geneticos-o-produtor-pergunta-a-embrapa-responde>
3. Aranda, A T. Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública. Biodiversidade da mata atlântica, 2014 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <http://otca.org/pt/a-importancia-das-colecoes-biologicas-para-a-conservacao-da-biodiversidade-2/>
4. Agertt, M K, Arabidian, L V, Cademartori, C, Beneduzi, A. Ocorrência de fungos filamentosos no ambiente de uma seção de coleções especiais. SaBios: Rev. Saúde e Biol. v.17, e022008, 2022-ISSN 1980-0002 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <https://anais.unilasalle.edu.br/index.php/sefic2019/article/download/1675/1766>
5. Amorim M C O, Ribeiro C S, Gusmão L F P. Manutenção e revisão da micoteca do programa de pesquisa de biodiversidade do semi-árido Brasileiro – ppbio, 2011-2012 [Acesso em 01 Janeiro 2023].
6. Mello S C M, Reis a, Silva J B T. Manual de Curadores de Germoplasma – Microorganismos: Fungos Filamentosos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. (25): 134 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em:



<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/933489/manual-de-curadores-de-germoplasma---micro-organismos-fungos-filamentosos>

7. Vero L, Boniotti M B, Budroni M, Buzzini P, Cassanelli S, Comuniana R, et al. Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections. *Microorganisms*, 2019. 7 (12): 685 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685>
8. Al-bedak, O A. A new low-cost method for long-term preservation of filamentous fungi. *Sciencedirect*, 2019 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101417>
9. Zimmermann A C. Avaliação da ação de filmes derivados de o-carboximetilquitosana sobre o crescimento microbiano. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e substâncias Bioativas)- Universidade do vale do Itajaí, 2013 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <https://siaiap39.univali.br/repositorio/handle/repositorio/1424>
10. Ruffatto K, Ziem J H, Maciel M J. Avaliação da viabilidade de células fúngicas em diferentes tipos de armazenamento UNIVANTES, *Estudo & Debate*, Lajeado, 2021. 28 (2): 7-17 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.22410/issn.1983-036X.v28i2a2021.2638>
11. Matos R S M, Souza, I F, Santos C R, Santos A C, Silva, I R. Avaliação da viabilidade de preservação Castelanni na conservação de fungos. Editora científica digital, 2021 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <file:///C:/Users/leand/Downloads/desenvolvimento-rural-e-processos-sociais-nas-ciencias-agrarias.pdf>
12. Rodriguez R, Santos C, Simões MF, Soares C, Santos C, Lima N. Polyphasic, Including MALDI-TOF MS, Evaluation of Freeze-Drying Long-Term Preservation on *Aspergillus* (Section Nigri) Strains. *Microorganisms*. 2019 Aug 25;7(9):291 [Acesso em 01 Janeiro

2023]. Disponível em: [doi: 10.3390/microorganisms7090291](https://doi.org/10.3390/microorganisms7090291). PMID: 31450658; PMCID: PMC6780240.

13. Queiroz, C, Souza, A C B. Production of hidrolitic enzymes by filamento fungi in different solid sbstrates. BRASILIAM JOURNAL OF DEVELOPMENTS, 2020 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-725>

14. Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Nováková A, Chen AJ, Arzanlou M, Larsen TO, Sklenář F, Mahakarnchanakul W, Samson RA, Houbraken J. Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Stud Mycol. 2019 Jun;93:1-63. Epub 2018 Jul 31. PMID: 30108412; PMCID: PMC6080641. [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1016/j.simyco.2018.06.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001).

15. Gêa, C C. Avaliação de fungos entomopatogênicos obtidos de diferentes ecossistemas brasileiros no controle biológico de Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) e de Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae). Repositório Institucional UNESP, 2022 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/236740>

16. Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of Candida albicans in mice. Zentralbl Bakteriol. 1990 Aug;273(3):332-43. PMID: 2206203. [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1016/s0934-8840\(11\)80437-8](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(11)80437-8).

17. Torres-García JL, Ahuactzin-Pérez M, Fernández FJ, Cortés-Espinosa DV. Bisphenol A in the environment and recent advances in biodegradation by fungi. Chemosphere. 2022 Sep;303(Pt 1):134940 Epub 2022 May 16. PMID: 35588877. [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134940](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134940).

18. Carobeli L R, Diniz B V, Carvalho N M M, Chinen L Y, Tonoye J L, Svidzinski T I E, et al. Fatores de virulência de fungos relacionados a zoonoses isolados em ambiente de banho e

tosa de um pet shop. Revista saúde e meio Ambiente- RESMA, 2019. 9 (2): 49-65 [Acesso em 01 Janeiro 2023].

19. Dabiri S, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. *J Mycol Med*. 2018 Sep;28(3):437-442 Epub 2018 May 18. PMID: 29778633 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1016/j.mycmed.2018.04.009](https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.04.009).

20. Latgé J P, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Ver*, 2019 13;33 (1):140-18 [Acesso em 01 Janeiro 2023].

21. Pascual, P F, González, P F, Arrones, O M M, Gómez, L M. Aspergilosis cutânea secundaria pustulosa en paciente inmunosuprimido. *Actas Dermosifiliogr*. 2017 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2017.07.004>

22. Raksha, Singh G, Urhekar, A D. Detecção de Fatores de Virulência em Isolados de *Aspergillus* de Amostras Clínicas e Ambientais. *Journal of Clinical e diagnostic Research*, 1 de julho de 2017 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.7860/JCDR/2017/24055.10211](https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24055.10211)

23. Castellani, A. A viabilidade de alguns fungos patogênicos em água Destilada. *Jornada de Medicina Tropical e Higiene*. V.42,p.225-226,1939 [Acesso em 01 Janeiro 2023].

24. Koneman, E. *Diagnóstico Microbiológico*. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.996-1020 [Acesso em 01 Janeiro 2023].

25. Spíndola M E L, Benassi V M, Vasconcelos J C, Marinho G O. Análise da temperatura de crescimento de fungos filamentosos coletados em minas gerais. *Blucher chemical Engineering proceeding, Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2019* [Acesso em 01 Janeiro 2023].

26. Bennett, J W, Klich, M A. *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Stoneham, Massachusetts: Butterworth-Heinemann. 448p. 1992 [Acesso em 01 Janeiro 2023].
27. Horn, B W, Gell, RM, Singh, R, Sorensen, R B, Carbone, I. Sexual Reproduction in *Aspergillus flavus* Sclerotia: Acquisition of Novel Alleles from Soil Populations and Uniparental Mitochondrial Inheritance. *PLoS One*, v.11, n.1, p.1-22, 2016 [Acesso em 01 Janeiro 2023].
28. Zin WW, Prompanya C, Buttachon S, Kijjoa A. Bioactive Secondary Metabolites from a Thai Collection of Soil and Marine-Derived Fungi of the Genera *Neosartorya* and *Aspergillus*. *Curr Drug Deliv*. 2016;13(3):378-88 PMID: 26935258 2016 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.2174/1567201813666160303104641](https://doi.org/10.2174/1567201813666160303104641).
29. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002 Jun;45(5-6):160-5. PMID: 12100532. [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x).
30. Diogo, H C, Sarpieri A, Pires M C. Fungi preservation in distilled water. *An Bras Dermatol*. 2005;80(6):591-4, 2023 [Acesso em 01 Janeiro 2023].
31. Torres K B. Viabilidade e caracterização fisiológica de fungos preservados em água destilada esterelizada na micoteca URM. ATENA, repositório digital da UFPE, 2008 [Acesso em 01 Janeiro 2023].
32. Levis C, Flores BM, Mazzochini GG, Manhães AP, Campos-Silva JV, Borges de Amorim P, Peroni N, Hirota M, Clement CR. Help restore Brazil's governance of globally important ecosystem services. *Nat Ecol Evol*. 2020 Feb;4(2):172-173 PMID: [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [32015426 doi: 10.1038/s41559-019-1093-x](https://doi.org/10.1038/s41559-019-1093-x).
33. Benassi, V M, Almeida, A. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais

produtores de amilase. REVISTA UNIMONTES CIENTÍFICA, 2018 [Acesso em 01 Janeiro 2023].

34. Tian T, Qiao W, Han Z, Wen X, Yang M, Zhang Y. Effect of temperature on the persistence of fecal bacteria in ambient anaerobic digestion systems treating swine manure. *Sci Total Environ.* 2021 Oct 15;791:148302 Epub 2021 Jun 5. PMID: 34126495 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148302](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148302).

35. Gonçalves V N, Cantrell C L, Wedge D E, Ferreira M C, Soares M A, Jacob M R, et al. Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. *Environ Microbiol.* 2016 Jan;18(1):232-45. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26235221 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1111/1462-2920.13005](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13005).

36. D'elia G M A. Prospecção de Metabólitos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) para Atividade Antimicrobiana e Produção de Proteases. Trabalho de Conclusão de Curso: Universidade do Estado do Amazonas – UEA Escola Normal Superior – ENS licenciatura em ciências biológicas, 2021 [Acesso em 01 Janeiro 2023].

37. Oliveira H M S. Perfil enzimático de fungos colonizadores e agentes de pneumopatias. Dissertação, Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2011 [Acesso em 01 Janeiro 2023].

38. Di Raimondo C, Del Duca E, Silvaggio D, Di Prete M, Lombardo P, Mazzeo M, Spallone G, Campione E, Botti E, Bianchi L. Cutaneous mastocytosis: A dermatological perspective. *Australas J Dermatol.* 2021 Feb;62(1):e1-e7 Epub 2020 Oct 11. PMID: 33040350 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1111/ajd.13443](https://doi.org/10.1111/ajd.13443).

39. Dabiri S, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species

isolated from clinical specimens. J Mycol Med. 2018 Sep;28(3):437-442. Epub 2018 May 18. PMID: 29778633 [Acesso em 01 Janeiro 2023]. Disponível em: [doi: 10.1016/j.mycmed.2018.04.009](https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.04.009).

40. Carvalho, L I C. Aspergillus e Aspergilose – desafios no combate da Doença. Universidade Fernando Pessoa Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas Porto, 2013 [Acesso em 01 Janeiro 2023].