

Potencial antimicrobiano e análise química qualitativa de metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus niger*

Antimicrobial potential and qualitative chemical analysis of secondary metabolites produced by *Aspergillus niger*

Potencial antimicrobiano y análisis químico cualitativo de metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus niger*

Recebido: 13/08/2025 | Revisado: 20/08/2025 | Aceitado: 21/08/2025 | Publicado: 23/08/2025

Helayne Bighi Manzoli¹

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-3457-9220>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: helaynemanzoli19@gmail.com

Vitória Maciel Delai²

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2682-1248>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: vitoria.delai@unioeste.br

Alexandre Maller³

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8065-9184>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: alexandre.maller@unioeste.br

Fabiana André Falconi⁴

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1377-8247>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: Fabiana.Falconi@unioeste.br

Marina Kimiko Kadowaki⁵

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9174-5811>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: marinakk@gmail.com

Maria Tereza Rojo de Almeida⁶

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1957-8561>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: Maria.almeida9@unioeste.br

Resumo

Os antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas, com capacidade de eliminação ou inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, causadores de infecções. Fatores relacionados a resistência bacteriana aumentam a demanda por novas substâncias naturais com ação antimicrobiana. Diante disto, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos obtidos de *Aspergillus niger* OI3R1, previamente isolado de solo do estado do Paraná (Brasil), bem como realizar uma análise qualitativa dos seus metabólitos secundários. Os extratos foram produzidos em meios semissólidos de arroz e aveia com palha de soja e testados através do método de difusão em ágar contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a realização das análises do perfil químico por cromatografia em camada delgada (CCD) para caracterização dos componentes dos extratos e frações obtidas por partição com solventes de polaridades crescentes. As frações acetato de etila (Fr AcOEt) e diclorometano (Fr CH₂Cl₂)

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica, Cascavel, PR, Brasil.

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Laboratório de Bioquímica, Cascavel, PR, Brasil.

³ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Laboratório de Bioquímica, Cascavel, PR, Brasil.

⁴ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Cascavel, PR, Brasil.

⁵ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, Cascavel, PR, Brasil.

⁶ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica, Cascavel, PR, Brasil.

de ambos os extratos apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados cromatográficos caracterizaram a presença de alcaloides, quinonas, amins e outros compostos nitrogenados, componentes majoritários possivelmente relacionados à atividade biológica.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Compostos bioativos; CCD; Fungos filamentosos; Teste de susceptibilidade.

Abstract

Antibiotics are natural or synthetic substances capable of eliminating or inhibiting the growth of pathogenic microorganisms that cause infections. Factors related to bacterial resistance increase the demand for new natural substances with antimicrobial action. In view of this, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential of extracts obtained from *Aspergillus niger* OI3R1, previously isolated from soil in the state of Paraná (Brazil), as well as to carry out a qualitative analysis of its secondary metabolites. The extracts were produced in semi-solid rice and oat media with soybean straw and tested using the agar diffusion method against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as carrying out chemical profile analyses using thin layer chromatography (TLC) to characterize the components of the extracts and fractions obtained by partitioning with solvents of increasing polarity. The ethyl acetate (Fr AcOEt) and dichloromethane (Fr CH₂Cl₂) fractions of both extracts showed activity against *Pseudomonas aeruginosa*. The chromatographic results showed the presence of alkaloids, quinones, amines and other nitrogenous compounds, the main components possibly related to the biological activity.

Keywords: Antibacterial activity; Bioactive compounds; TLC; Filamentous fungi; Susceptibility test.

Resumen

Los antibióticos son sustancias naturales o sintéticas con capacidad para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos causantes de infecciones. Los factores relacionados con la resistencia bacteriana aumentan la demanda de nuevas sustancias naturales con acción antimicrobiana. Ante esto, el objetivo de este estudio es evaluar el potencial antimicrobiano de los extractos obtenidos de *Aspergillus niger* OI3R1, previamente aislado del suelo del estado de Paraná (Brasil), así como realizar un análisis cualitativo de sus metabolitos secundarios. Los extractos se produjeron en medios semisólidos de arroz y avena con paja de soja y se probaron mediante el método de difusión en agar contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como mediante análisis del perfil químico por cromatografía en capa fina (CCF) para caracterizar los componentes de los extractos y las fracciones obtenidas por partición con disolventes de polaridad creciente. Las fracciones de acetato de etilo (Fr AcOEt) y diclorometano (Fr CH₂Cl₂) de ambos extractos mostraron actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados cromatográficos caracterizaron la presencia de alcaloides, quinonas, amins y otros compuestos nitrogenados, componentes mayoritarios posiblemente relacionados con la actividad biológica.

Palabras clave: Actividad antibacteriana; Compuestos bioactivos; CCF; Hongos filamentosos; Pruebas de susceptibilidad.

1. Introdução

Os fungos são habitualmente utilizados como fermentadores na produção de alimentos, bebidas alcoólicas e na indústria farmacêutica, para obtenção de insumos. Estes participam de diversos processos como biodegradação e tratamento de efluentes, produção de enzimas de interesse e na biotransformação. No contexto ambiental e agrícola, esses organismos contribuem significativamente para a manutenção da estabilidade ecológica, atuando na decomposição de matéria orgânica, na biorremediação de compostos tóxicos e no estímulo ao crescimento vegetal, além de oferecerem proteção contra patógenos (Abreu *et al.* 2015).

O metabolismo fúngico pode dispor de diversos compostos naturais que apresentam atividades biológicas, dividindo-se em metabólitos primários e secundários, este último tipo é frequentemente bioativo e pode apresentar importância à terapêutica, devido a suas atividades farmacológicas, incluindo ações antibióticas, imunossupressoras e citotóxicas (Bérdy, 2005; Mendonza *et al.* 2022). Estes compostos possuem estruturas químicas complexas e atendem às necessidades de seus organismos produtores, como defesa, competição entre espécies, facilitação de processos reprodutivos, comunicação química, mediações simbióticas e demais ações necessárias para as interações ecológicas e permanência das espécies. Essas funções ecológicas muitas vezes estão associadas a potenciais aplicações terapêuticas (Gómez, 2011; Spiteller, 2015).

Entre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* destaca-se pela ampla distribuição geográfica e capacidade de colonizar diversos substratos, sendo comum em solos, ambientes aquáticos, plantas e alimentos deteriorados (Bennette, 2010).

O *Aspergillus niger*, em particular, apresenta crescimento eficiente sob diferentes condições ambientais, incluindo variações significativas de temperatura e umidade (Krijghesheld *et al.* 2013). Essa adaptabilidade, aliada à segurança do seu uso industrial, torna a espécie uma produtora promissora de compostos bioativos (Pradi, 2023).

Estudos com *A. niger* já identificaram uma diversidade de metabólitos secundários, pertencentes a várias classes químicas, como nafto- γ -pironas, α -pironas, bicumarinas, azafilonas, piranonogrinas, ciclopeptídeos, dicetopipetazinas, derivados do ácido itacônico, esteróides, pigmentos, lipídeos, micotoxinas, yanutonas, terpenos, entre outros (Uchôa, 2017). Esses compostos exibem diversas atividades biológicas relevantes, como ações antimicrobianas, antiparasitárias, antioxidantes, antivirais, anticancerígenas, além de propriedades enzimáticas específicas (Li *et al.*, 2015, Pamphile *et al.* 2017; Pradi, 2023). Vistas as diversas e promissoras aplicações de substâncias biologicamente ativas produzidas por fungos, em especial pelos fungos filamentosos *Aspergillus sp.*, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos obtidos de *Aspergillus niger* OI3R1, previamente isolado de solo do estado do Paraná (Brasil), bem como realizar uma análise qualitativa dos seus metabólitos secundários.

2. Metodologia

Realizou-se uma pesquisa experimental, laboratorial e, de natureza qualitativa e quantitativa (Pereira *et al.*, 2018).

2.1 Obtenção dos extratos

O fungo *Aspergillus niger* – linhagem OI3R1, foi isolado de amostras de solo coletadas no bioma Mata Atlântica, localizado no Refúgio Biológico Bela Vista (Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil). A identificação taxonômica do fungo foi baseada na análise dos produtos amplificados com primers para regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) em genes ribossomais, utilizando a metodologia descrita por White *et al.* (1990). A linhagem faz parte da coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, onde encontra-se preservado.

2.2 Cultivo do fungo

Inicialmente, o fungo foi cultivado em meio BDA (Ágar Batata Dextrose), por 10 dias a 28 °C para obtenção de esporos e manutenção de repiques. Em seguida, 15 mL de suspensão de esporos $1,0 \times 10^5$ /mL foram adicionados em caldo de pré-fermentação YESD (20 g de peptona de soja, 20 g de dextrose, 5 g de extrato de levedura para 1000 mL de água destilada) produzindo 140 mL deste em Erlenmeyer de 500 mL. As culturas foram incubadas por 3 dias em BDO (Baixa Demanda de Oxigênio), a 28 °C. Finalizada a pré-fermentação, foram transferidos 10 mL do caldo para os meios semissólidos, sendo: 6 frascos de Erlenmeyer com meio arroz (10 g arroz e 25 mL de água destilada) e 6 frascos de Erlenmeyer com aveia com palha de soja (10 g de farinha de aveia e 2 g de palha de soja e 50 mL de água destilada). A fermentação em meios semissólidos foi realizada em condições de BDO, com temperatura de 28 °C por 60 dias (Negreiros *et al.*, 2021; VanderMolen *et al.*, 2013).

2.3 Obtenção e fracionamento dos extratos

Após o cultivo do fungo em escala piloto, foram adicionados 50 mL de água destilada nas culturas semissólidas e agitadas por 15 minutos a 120 rpm em incubadora tipo shaker a 20 °C, para homogeneização. Em seguida, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner e papel filtro Whatman nº1, produzindo assim os extratos brutos do meio de arroz (ExA) e do meio de aveia com palha de soja (ExAPS) (Dudek *et al.*, 2017).

Os extratos brutos ExA e ExAS foram particionados por extração líquido-líquido por três vezes com solventes em ordem crescente de polaridade: Hexano, Diclorometano e Acetato de Etila na proporção 1:1 (v/v). Após particionamento, quatro frações

foram geradas, sendo designadas: Fração Hexano (Fr Hex), Fração Diclorometano (Fr CH₂Cl₂), Fração Acetato de Etila (Fr AcOEt) e a Fração Aquosa residual (Fr Aq). As frações foram desidratadas em um evaporador rotativo e em seguida calculado o rendimento de sua massa seca em mg, através da pesagem em balança semi-analítica. Posteriormente, cada fração foi concentrada com 5 ml de seu respectivo solvente e armazenada à temperatura de 5 °C (Negreiros *et al.*, 2021).

2.4 Testes de susceptibilidade antimicrobiana

Para o teste de atividade antimicrobiana, foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes do laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. Inicialmente as bactérias foram inoculadas em meio TSB (Caldo Triptona de Soja) para crescimento, o procedimento foi realizado em triplicata para cada bactéria, seguida de incubação a 37 °C por 24 h. Após este período, as bactérias foram inoculadas em ágar nutriente (NA), produzido em duplicata e incubado novamente a 37 °C por 24 h. A partir do meio NA foi realizado a padronização das bactérias de acordo com a escala de Mac Farland 0,5 (1,5x10⁸ UFC/mL) em 10 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Com auxílio de Swab estéril, a solução foi inoculada em placas de petri contendo ágar Mueller Hinton (MH), em 8 placas para cada bactéria, totalizando 16 placas. Em seguida foram adicionados os discos com as frações particionadas de cada meio. Para a produção dos discos, as frações foram diluídas com água estéril em uma concentração de 200 mg/mL para cada fração dos extratos (ExA e ExAS) e adicionados em discos estéreis, pipetando 10 µL em cada disco. Para os controles negativos foram produzidos discos com Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e água estéril. Para o controle positivo foi utilizado Gentamicina 10 µg. O procedimento foi realizado em duplicata (Negreiros *et al.*, 2021; BrCast, 2021). Após incubação foram medidos os halos de inibição para os controles negativo e positivo e para cada fração do extrato, apresentando o resultado em milímetros (mm).

2.5 Prospecção química cromatográfica

Para as frações Fr AcOEt e Fr CH₂Cl₂ de ambos os extratos que apresentaram atividade contra as bactérias testadas, foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) para caracterização do perfil químico das amostras. As cromatografias foram preparadas utilizando cromatoplasmas de alumínio com sílica GF254 e fase móvel composta por diclorometano 100% e diclorometano:acetato de etila (8:2), respectivamente. Após o desenvolvimento da cromatografia, as cromatoplasmas foram observadas sob câmara de luz ultravioleta de 254 nm e 364 nm e posterior revelação química com vanilina sulfúrica, hidróxido de potássio, reagente de Ehrlich e reagente de Dragendorff, separadamente, considerando o tipo de composto a ser evidenciado (Wagner, 1996). A Tabela 1 apresenta a relação entre a fase móvel e os reagentes utilizados na caracterização da classe de composto orgânico.

Tabela 1 - Bateria de eluentes e reveladores utilizados para as respectivas Frações Fr AcOEt e Fr CH₂Cl₂ dos extratos de meio de cultura com arroz e meio aveia com palha de soja

Classes de compostos	Quinonas	Aminas	Alcaloides	Compostos gerais
Eluente	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (8:2)	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂
Revelador	KOH 10% em metanol	Ehrlich	Dragendorff	Vanilina Sulfúrica

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

3. Resultados e Discussão

Observou-se que o extrato obtido do cultivo em meio semissólido à base de aveia, com a adição de palha de soja (ExAPS), apresentou rendimentos de resíduos de massa micelial superiores em suas frações quando comparado ao meio que continha exclusivamente arroz (ExA), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimentos dos resíduos de massa micelial seca proveniente das frações, em mg, após secura evaporador rotativo.

Fração/ Extrato	ExA (mg)	ExAPS (mg)
Fr HEX	159	2.709
Fr CH ₂ CL ₂	270	372
Fr AcOEt	821	3.700
Fr AQ	3.893	5.152

ExA = Extrato do meio Arroz; **ExAPS** = Extrato do meio aveia com palha de soja; **Fr HEX** = fração hexano; **Fr CH₂CL₂** = fração diclorometano; **Fr AcOEt** = fração acetato de etila; **Fr AQ** = fração aquosa residual. Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Esse resultado pode estar relacionado à incorporação da palha de soja no meio de cultivo, a qual foi empregada em sua forma bruta, sem a realização prévia de trituração ou moagem. O tamanho maior das partículas desse substrato pode ter beneficiado a aeração do ambiente devido aos espaços formados entre si, propiciando uma oxigenação mais eficiente e, por conseguinte, favorecendo o crescimento fúngico. A aeração do meio de cultura permite manter as condições aeróbicas, eliminar o dióxido de carbono formado, regular temperaturas e ajustar umidade (Rocha, 2010; Donini *et al.*, 2006). Adicionalmente, a palha de soja proporcionou como uma fonte adicional de carbono e nitrogênio, contribuindo para a eficácia do metabolismo microbiano ao longo do processo de fermentação.

A otimização do ambiente e nutrição do meio de cultura para crescimento de microrganismo tem impactos positivos sobre a quantidade e diversidade de metabólitos secundários produzidos, influenciando diretamente na descoberta de novos compostos bioativos (VanderMolen *et al.*, 2013). A manipulação do meio de crescimento com arroz e aveia com palha de soja aumentou a oferta de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento do fungo. O carbono proporciona a base para a formação da biomassa fúngica e produção de metabólitos secundários, enquanto o nitrogênio se faz necessário para a produção de proteínas e ácidos nucleicos (Negreiros *et al.*, 2021).

Meios de cultura sólidos contendo arroz e farelo de aveia, já foram descritos anteriormente como favoráveis ao crescimento de fungos e produção de uma variedade de metabólitos secundários, demonstrando que meios de crescimento enriquecidos com esses substratos são promissores para a pesquisa de novos compostos bioativos (VanderMolen *et al.*, 2013; Negreiros *et al.*, 2021). Anteriormente, o cultivo do fungo *A. niger* em meios semissólidos contendo arroz como substrato proporcionou seu crescimento e produção de metabólitos bioativos, apresentando atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Chagas, 2017).

Em uma pesquisa de Rocha (2010), empregou-se o fungo *A. niger* em meios de cultura com resíduos industriais do processamento de arroz e do maracujá, para otimização da produção de enzimas (invertase, amilase, celulase, pectinase e protease) por Fermentação em Estado Sólido e foi possível observar um resultado satisfatório em seu crescimento.

Neste mesmo sentido, Bolson *et al.* (2020) avaliaram o crescimento micelial de *Lentinus sajor-caju*, uma espécie de cogumelo comestível, em meios de cultura a base de palha de soja, arroz, milho e batata. Como resultado, todos os meios foram

satisfatórios para o crescimento do fungo, porém a palha de soja 33 apresentou um maior desempenho no crescimento do fungo, gerando um aumento da massa micelial mais rapidamente que os demais.

3.1 Atividade antibacteriana das frações

Os halos de inibição produzidos pelas frações testadas contra *P. aeruginosa* foram analisados, incluindo os controles positivos e negativos. Não foram identificadas atividade antimicrobiana nos controles negativos, corroborando a inexistência de interferências e a fidedignidade dos resultados obtidos com as frações analisadas. O controle positivo, gentamicina, demonstrou halos de inibição de 32 mm e 35 mm nos testes com frações provenientes dos meios arroz (ExA) e aveia com palha de soja (ExAPS), respectivamente (Tabela 3). Esses valores foram utilizados como parâmetro para a comparação da atividade antibacteriana das frações avaliadas.

Tabela 3 - Determinação dos halos de inibição (mm) do controle positivo e das frações dos extratos ExA e ExAPS de *A. niger* contra *Pseudomonas aeruginosa*.

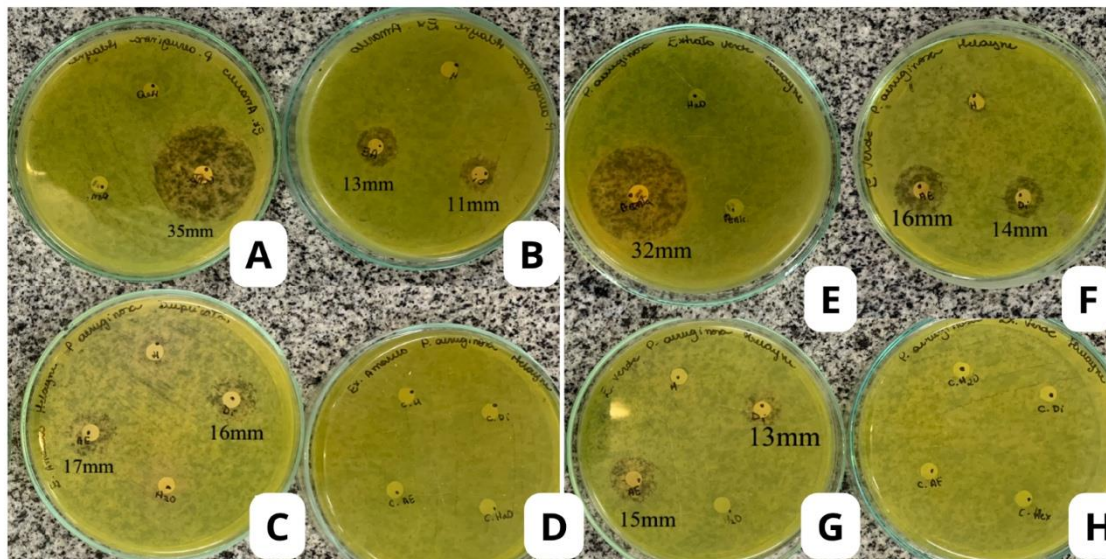
Frações	Halo de inibição (mm)	
	ExA	ExAPS
Controle Positivo	32	35
Fr ACOEt	15 e 16	13 e 17
FCH ₂ Cl ₂	13 e 14	11 e 16
FHex	-	-
Faq	-	-

Controle positivo = gentamicina; **ExA** = Extrato do meio Arroz; **ExAPS** = Extrato do meio aveia com palha de soja; **Fr CH₂Cl₂** = fração diclorometano; **Fr AcOEt** = fração acetato de etila; **Fr Hex** = Fracao Hexano **Fr AQ** = fração aquosa. Fonte: Dados da pesquisa (2025).

As frações Fr AcOEt (acetato de etila) e Fr CH₂Cl₂ (diclorometano) apresentaram atividade relevante contra *P. aeruginosa*, tanto nos extratos obtidos em meio de arroz quanto nos extraídos em meio de aveia com palha de soja (Figura 1). Esse achado indica que os compostos bioativos com capacidade antimicrobiana tendem a se concentrar principalmente nas frações de polaridade média. Por outro lado, as frações Fr Hex (hexano) e Fr Aq (fração aquosa) não demonstraram atividade contra a bactéria avaliada, o que sugere a ausência ou uma baixa concentração de metabólitos com propriedades antibacterianas nessas amostras.

Nos ensaios de atividade antimicrobiana contra *E. coli*, foram observados halos de inibição de 29 mm e 33 mm para os controles positivos relacionados aos extratos cultivados em meio arroz (ExA) e em meio aveia com palha de soja (ExAPS), respectivamente. Em contrapartida, as frações FAcOEt e FCH₂Cl₂ oriundas de ambos os extratos não evidenciaram atividade antimicrobiana significativa, dado que ocorreram crescimento de colônias bacterianas dentro dos halos e formação de colônias isoladas na superfície da placa. Conforme as orientações do BrCAST (2021), a formação de colônias no interior do halo de inibição deve ser considerada, concluindo que a bactéria apresentou resistência ao composto testado. As frações FHex e FAq também não evidenciaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, apresentando um resultado similar ao verificado para *P. aeruginosa*, o que sugere uma provável ausência de metabólitos bioativos nessas frações nas condições avaliadas.

Figura 1 - Teste de susceptibilidade bacteriana das frações extraídas do meio de cultivo de arroz e meio de aveia com palha de soja contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.



A, B, C e D: Frações provenientes do meio de cultivo contendo arroz **A.** Placa com Fr Aq e controle positivo Gentamicina (35 mm) **B.** Placa com Fr Hex, Fr AcOEt (13 mm) e Fr CH₂CL₂ (11 mm). **C.** Duplicata com Fr Hex, Fr CH₂CL₂ (16 mm), Fr AcOEt (17 mm) e Fr Aq. **D.** Placa com controles negativos. **E, F, G e H:** Frações provenientes do meio de cultivo contendo aveia com palha de soja. **E.** Placa com Fr Aq e controle positivo gentamicina (32 mm). **F.** Placa com as Fr Hex, Fr AcOEt (16 mm) e Fr CH₂CL₂ (14 mm). **G.** Duplicata com Fr Hex, Fr CH₂CL₂ (13 mm), Fr AcOEt (15 mm) e Fr Aq. **H.** Placa com controles negativos. Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Como previsto, a Fr Hex proveniente do cultivo com aveia e palha de soja obteve maior rendimento (2.709 mg) em relação a Fr Hex meio arroz (159 mg), apesar disto ambas as frações não apresentaram atividade antimicrobiana, em consequência de seus compostos majoritários possuírem característica não polar. Este resultado corrobora com pesquisas anteriores, considerando que a lavagem das frações com solvente Hexano elimina substâncias comuns e indesejadas, tais como ácidos graxos e demais compostos não polares, desinteressantes para identificação de compostos bioativos.

Apesar disso, vários estudos evidenciam a capacidade antimicrobiana de extratos e frações de *A. niger* cultivados em substratos distintos. Gómez (2011) detectou uma atividade na fração acetato de etila do extrato de *A. niger* em relação a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, apontando a terreína e 1H-2-Benzopiran-1-ona, 3,4-dihidro-3,8-dihidroxi-3-metil-, uma cumarina originada do ácido chiquímico como possíveis compostos ativos. Esses compostos secundários têm sido extensivamente correlacionados à atividade antimicrobiana apresentada por fungos filamentosos. Os metabólitos secundários produzidos pelo fungo *A. niger*, em sua grande maioria são constituídos por nafto- γ -pironas, sob todas as condições de cultura. Os efeitos biológicos das nafto- γ -pironas foram investigados, demonstrando ação antimicrobiana. Este grupo é composto por aurasperonas, foncesinonas e nigeronas, além de monômeros de flavasperona e rubrofusarina B (Nielsen *et al.*, 2009).

Pesquisas complementares, como a realizada por Hasegawa *et al.* (2007), auxiliaram na identificação de novos compostos sintetizados por *A. niger*, dentre os quais se destacam os ácidos tensuicos A-F, sendo o ácido tensuico C especialmente relevante, uma vez que demonstrou significativa inibição de *B. subtilis*.

No estudo conduzido por Pinheiro *et al.* (2013), o fungo *Aspergillus sp.* foi isolado da planta medicinal *Bauhinia guianensis* e cultivado em meio à base de arroz, com o objetivo de favorecer seu crescimento e a produção de metabólitos secundários. A análise química dos extratos resultou no isolamento de dois alcaloides fumigaclavina C e pseurotina A, que apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtili*

Song *et al.* (2008) realizaram o fracionamento do extrato de *A. niger* isolado de *Cyndon dactylon* e evidenciaram a presença de quatro compostos conhecidos do grupo de nafto- γ -pironas, sendo estes a rubrofusarina B, fonsecinona A, asperpirona A e aurasperona A, que foram investigados biologicamente. Através das análises foi possível identificar atividade antimicrobiana dos quatro compostos, contra as bactérias *B. Substilis*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorences* e contra os fungos *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*. O composto Aurasperona A apresentou ação semelhante ao Cetoconazol, utilizado como controle para fungos.

Estudos mais recentes igualmente destacam o potencial biotecnológico de *A. niger*. Alves (2023), ao analisar extratos do *A. niger* isolado de folhas de *Euterpe oleracea*, constatou uma atividade significativa das frações aquosa e acetato de etila em relação a *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella sp.* De maneira similar, Calado (2018) detectou atividade antimicrobiana em amostras de *Aspergillus fumigatus* obtidas da compostagem do zoológico de São Paulo, demonstrando um amplo espectro de ação que detectou 23 amostras ativas contra *S. aureus*, 15 contra *B. cereus* e uma contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

3.2 Prospecção química por CCD

Os testes cromatográficos para verificação dos perfis químicos dos extratos e das frações foram realizados utilizando-se diferentes fases móveis e métodos de revelação, incluindo observação sob luz UV 254 nm e 365 nm, além de reagentes gerais e específicos apropriados para revelação de certas categorias de compostos orgânicos (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização química das frações derivadas dos extratos de cultivo de *A. niger*.

Compostos (reagentes)	Fr AcOEt (ExA)	Fr CH ₂ Cl ₂ (ExA)	Fr AcOEt (ExAPS)	Fr CH ₂ Cl ₂ (ExAPS)
Quinonas (KOH 10% em metanol)	NE	Positivo (vermelho)	NE	Positivo (vermelho)
Aminas e nitrogenados (Reagente de Ehrlich)	Negativo *	Positivo (vermelho – Aminas)	Negativo *	Negativo*
Alcaloides (Dragendorff)	Positivo (laranja)	Positivo (laranja)	Positivo (laranja)	Positivo (laranja)
Compostos orgânicos gerais (Vanilina Sulfúrica)	Positivo**	Positivo**	Positivo**	Positivo**

* **Negativo:** para cores vermelhas (aminas), com formação de outras cores (outros compostos nitrogenados).

** **Positivo:** formação de diversas cores devido a diferentes classes químicas.

NE: Não evidenciado. **ExA** = Extrato de cultivo com Arroz; **ExAPS** = Extrato de cultivo com aveia e palha de soja; Fonte: Dados da pesquisa (2025).

No sistema cromatográfico constituído por diclorometano: acetato de etila (8:2) e revelado com KOH 10%, observou-se manchas avermelhadas em R_f ~ 0,75 e R_f ~ 0,96 para as frações Fr CH₂Cl₂ do cultivo com arroz (ExA) e do cultivo de aveia com palha de soja (ExAPS), respectivamente, sugerindo a presença de quinonas. Wu *et al.*, (2008) relataram a presença de dois

derivados de antraquinonas no extrato fúngico de *A. niger* isolado da água do mar, entre eles a Averufina e Nidurufin. Esses derivados foram testados quanto a sua capacidade inibitória da replicação do Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV – Tobacco mosaic virus), para o qual ambos apresentaram atividade moderada na inibição de sua multiplicação. No mesmo sentido, um novo derivado naftoquinonaimina foi identificado no extrato fúngico de *A. niger* isolado da alga marinha *Colpomenia sinuosa*, nomeadamente 5,7-dihidroxi-2-[1-(4-metoxi-6-oxo-6H-pirano-2-il)-2-feniletilamino]-[1,4]naftoquinona. Esse composto apresentou moderada ação antifúngica contra *Candida albicans*, com zonas de inibição de 10 mm em 0,2mg/poço (Zhang *et al.*, 2007). Outros compostos isolados dessa classe são citados na literatura, sendo eles Rheomodina, Homonataloin B, Canarione, Tanshindiol B e 4- Hidroxianidroflavomannin-9,10-quinona (Pradi, 2023).

Para a caracterização da presença de amins e demais compostos nitrogenados nos extratos, as cromatoplaças foram reveladas com reagente de Ehrlich, após eluição com diclorometano 100%. Somente a fração Fr CH₂Cl₂ do cultivo com arroz (ExA) revelou uma mancha vermelha, em R_f ~ 0,26, sugestiva da presença de compostos nitrogenados, conforme sugerido por Nielsen *et al.*, (2009), como as fumonisinas, ocratoxinas, malforminas e asperazinas. As malforminas são moléculas pertencentes ao grupo de ciclopeptídeos e já foram isolados anteriormente do metabolismo deste fungo, destacando as Malforminas A e C sendo evidenciadas suas ações antimicrobianas, tripanocida, antimalárica e citotóxica (Zhou *et al.*, 2016; Uchôa, 2017; Pradi, 2023).

Em um estudo metabolômico de Pradi (2023), foi realizado o cocultivo do fungo *A. niger* e *Saccharomyces cerevisiae*, onde foi possível isolar uma diversidade de moléculas, entre eles os compostos nitrogenados Fumonisin B₂, carbonarone A e B, aspernigrina A, B e C, pestalamida A e B, nigragilina, nigerazina B, Tributilamina, Tripropilamina, Sclerolizina e Esfingosina.

Entre as amins, os alcaloides distinguem-se por sua reactividade com determinados reagentes, como o reagente de Dragendorff (iodo bismutato de potássio), o qual induz uma coloração alaranjada característica (Simões *et al.*, 2017). A confirmação da presença dessa classe de metabólitos nas amostras analisadas foi realizada por meio de revelação cromatográfica, evidenciada pelo surgimento de manchas alaranjadas em distintos valores de R_f.

No extrato bruto (ExA), na Fr CH₂Cl₂, foram identificadas manchas com R_f aproximadamente 0,76, 0,71 e 0,28. Na fração Fr AcOEt do extrato em questão, foram identificadas manchas com R_f aproximados de 0,96, 0,93, 0,78 e 0,26. No extrato proveniente do subproduto (ExAPS), foi observada uma mancha de coloração alaranjada com R_f aproximadamente 0,83 em ambas as frações Fr AcOEt e Fr CH₂Cl₂. Os resultados indicam uma variedade e uma grande quantidade de compostos alcaloides nas distintas frações dos extratos examinados, sendo esta classe química a mais predominante.

A literatura científica registra uma diversidade significativa de alcaloides extraídos de *A. niger*, salientando grupos estruturais como nigragilinas, piranonigrinas, nigerloxinas, pirofenos, tensidóis, nigerazinas, aspernigrinas, aspernigerinas, pestalamidas e aaptaminas, muitos dos quais demonstram atividades biológicas significativas (Fukuda *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2009; Uchôa, 2017; Pradi, 2023).

Além dos alcaloides, outros compostos orgânicos foram destacados por meio da aplicação de solução de vanilina sulfúrica, evidenciando a complexidade química dos extratos. Vários estudos documentam compostos isolados de *A. niger* oriundos de ambientes marinhos, endofíticos e terrestres. Entre as principais classes químicas reconhecidas, ressaltam-se os esteroides, diversas variedades de terpenos, flavonoides e fenilpropanoides, evidenciando a notável riqueza bioquímica detectada nas amostras analisadas.

4. Conclusão

O fungo *A. niger* OI3R1, isolado a partir do solo do Paraná e cultivado em meio de arroz e em meio de aveia com palha de soja, gerou extratos e frações que foram investigados em relação à atividade antibacteriana. As frações Fr AcOEt (acetato de

etila) e Fr CH₂Cl₂ (diclorometano), obtidas de ambos os extratos, apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*, evidenciando a existência de compostos com potencial antimicrobiano. A análise cromatográfica demonstrou um perfil químico variado, com destaque em quinonas, alcaloides e outros compostos nitrogenados. Os achados sugerem o potencial biotecnológico do *A. niger* OI3R1 na síntese de metabólitos secundários bioativos, com possíveis aplicações no desenvolvimento de agentes antimicrobianos.

Referências

- Abreu, J. A. S. D., Rovida, A. F. D. S., & Pamphile, J. A. (2015). Fungos de interesse: Aplicações biotecnológicas. *Uningá Review*, 21(1).
- Alves, D. (2023). *Atividade antitumoral e antibacteriana de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados de Euterpe oleracea Mart* (Dissertação de mestrado não publicada). Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto.
- Benette, J. W. (2007). An overview of the genus *Aspergillus*. In *The Aspergilli*. CRC Press.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26.
- Bolson, S., Batista Pereira, A., Franco, J., & Albuquerque, M. (2020). Cultivo de *Lentinus sajor-caju* (Fr.) Fr. em diferentes tipos de resíduos agrícolas. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 5(2).
- BrCAST. (2021). *Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos*. BrCAST.
- Calado, J. C. P. (2018). *Bioprospecção de potencial antimicrobiano, antiparasitário e antitumoral de metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero Aspergillus* (Tese de doutorado não publicada). Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.
- Chagas, M. B. de O., Santos, I. P. dos, Silva, L. C. N. da, Correia, M. T. dos S., de Araújo, J. M., Cavalcanti, M. da S., & Lima, V. L. de M. (2017). Antimicrobial activity of cultivable endophytic fungi associated with *Hancornia speciosa* Gomes bark. *The Open Microbiology Journal*, 11, 179–188.
- Donini, L. P., Bernardi, E., Minotto, E., & Nascimento, J. S. (2006). Efeito da suplementação com farelos no crescimento in vitro de *Pleurotus ostreatus* em meios à base de capim-elefante (*Pennisetum spp.*). *Arquivos do Instituto Biológico*, 73(3), 303–309.
- Dudek, D. N. (2017). Deleção parcial do fator de transcrição ACE1 para otimização da produção de celulasas por *Trichoderma reesei* RUT-C30 (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
- Fukuda, T., Hasegawa, Y., Hagimori, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., & Omura, S. (2007). Tensidols, new potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. *ChemInform*, 38(7).
- Gómez, G. C. D. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios obtenidos por fermentación en medio líquido de una cepa de *Aspergillus sp.* nativa del Páramo de Guasca, Cundinamarca [Tese de graduação, Pontificia Universidad Javeriana].
- Hasegawa, Y., Fukuda, T., Hagimori, K., Tomoda, H., & Omura, S. (2007). Tensyic acids, new antibiotics produced by *Aspergillus niger* FKI-2342, 55(9), 1338–1343.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74, 1–29.
- Li, X. B., Li, Y. L., Zhou, J. C., Yuan, H. Q., Wang, X. N., & Lou, H. X. (2015). A new diketopiperazine heterodimer from an endophytic fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17, 182–187.
- Mendoza, A. Y. G., Silva, V. V. da, Lima, R. A., & Lima, J. P. S. D. (2022). Potencialidades biotecnológicas dos fungos da Amazônia brasileira: Uma revisão sistemática. *Diversitas Journal*, 7(4).
- Negreiros, M. A., et al. (2021). Evaluation of culture media and conditions of Amazonian filamentous fungi in an antimicrobial screening program. *Research, Society and Development*, 10(14), e370101422065.
- Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1225–1242.
- Pamphile, J. A., Costa, A. T., Rosseto, P., Polonio, J. C., Pereira, J. O., & Azevedo, J. L. (2017). Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: O caso do *Colletotrichum sp.* *Revista Uningá*, 53(1).
- Pereira A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.
- Pinheiro, E. A. A., Carvalho, J. M., dos Santos, D. C. P., de Feitosa, A. O., Marinho, P. S. B., Guilhon, G. M. S. P., de Souza, A. D. L., da Silva, F. M. A., & do R. Marinho, A. M. (2013). Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus sp.* EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Natural Product Research*, 27(18), 1633–1638.
- Pradi, L. (2023). Estudo metabolômico da cocultura líquida de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de pós-graduação em Química. Florianópolis, SC.

- Rocha, C. P. (2010). Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido (Dissertação de pós-graduação). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Uberlândia, MG.
- Simões C. M. O., Schenckel E. P., Mello J. P. C., Mentz L. A & Petrovick P. R. (2017). *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. Artmed
- Song, Y. C., Li, H., Ye, Y. H., Shan, C. Y., Yang, Y. M., & Tan, R. X. (2004). Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters*, 241(1), 67–72.
- Spiteller, P. (2015). Chemical ecology of fungi. *Natural Product Reports*, 32(7), 971–993.
- Uchôa, P. K. S. (2017). Estudo do potencial químico-farmacológico de metabólitos secundários de fungos da costa cearense: *Aspergillus niger*. (Tese para doutorado). Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-graduação em Química. Fortaleza, CE.
- Vandermolen, K. M., Huzefa A. R., Tamam E. & Nicholas H. O. (2013). Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*, 3.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. (ed. 2, pp. 384). Germany: Springer Science & Business Media.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 315-322.
- Wu, Z.-J., Ouyang, M.-A., Su, R.-K., & Kuo, Y.-H. (2008). Two new cerebrosides and anthraquinone derivatives from the marine fungus *Aspergillus niger*. *ChemInform*, 39(35).
- Zhang, Y., Wang, S., Li, X.-M., Cui, C.-M., Feng, C., & Wang, B.-G. (2007). New sphingolipids with a previously unreported 9-methyl-C20-sphingosine moiety from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Lipids*, 42(8), 759–764.
- Zhou, X., Fang, W., Tan, S., Lin, X., Xun, T., Yang, B., Liu, S., & Liu, Y. (2016). Aspermigrins with anti-HIV-1 activities from the marine-derived fungus *Aspergillus niger* SCSIO Jcsw6F30. *ChemInform*, 47(19).