

**PAPEL BIOLÓGICO DA MELANINA EM *Arthrobotrys oligospora* (FRES.) NA  
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE AMBIENTAL E NA INTERAÇÃO FUNGO –  
NEMATOIDE**

**IZABELLI MARTINS DA SILVA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ  
JULHO/ 22**

**PAPEL BIOLÓGICO DA MELANINA EM *Arthrobotrys oligospora* (FRES.) NA  
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE AMBIENTAL E NA INTERAÇÃO FUNGO –  
NEMATOIDE**

**IZABELLI MARTINS DA SILVA**

Dissertação apresentada  
ao Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Biociências  
e Biotecnologia, área de  
concentração Biologia Celular.

**ORIENTADOR: PROF. DR. CLÓVIS DE PAULA SANTOS**

**COORIENTADOR: DR. DEIVID FRANÇA FREITAS**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ**

**JULHO/ 22**

**PAPEL BIOLÓGICO DA MELANINA EM *Arthrobotrys oligospora* (FRES.) NA  
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE AMBIENTAL E NA INTERAÇÃO FUNGO –  
NEMATÓIDE**

**IZABELLI MARTINS DA SILVA**

Dissertação apresentada  
ao Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Biociências  
e Biotecnologia, área de  
concentração Biologia Celular.

APROVADO EM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Dr. Olney Vieira-da-Motta (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

---

Dra. Isabele da Costa Angelo (Doutora em Medicina Veterinária - Parasitologia  
Veterinária) – UFRRJ

---

Dr. Richard Ian Samuels (Doutor em Entomologia) – UENF

---

Dr. Deivid França Freitas (Doutor em Biociências e Biotecnologia – Coorientador) –  
UENF

---

Dr. Clóvis de Paula Santos (Doutor em Medicina Veterinária-Parasitologia  
Veterinária- Orientador) – UENF

*“Um guerreiro sem espada, sem faca, foice ou facão, armado só de amor, segurando um giz na mão, o livro é seu escudo, que lhe protege de tudo que possa lhe causar dor, por isso eu tenho dito, tenho fé e acredito na força do professor.”*

(Bráulio Bessa)

*“Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, minha mãe, minha irmã, meu marido e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida”*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus por ter alcançado mais essa conquista.

À CAPES e à UENF pela concessão da bolsa de mestrado e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Clóvis de Paula Santos pela orientação e pelo incentivo para entrar no programa de pós graduação, e por todo o auxílio e atenção durante a caminhada.

Ao Dr. Deivid França Freitas pela coorientação, pela amizade, pelo suporte, e apoio.

Ao professor Dr. Olney Vieira da Motta por todo suporte, por abrir as portas do Laboratório de Doenças Infecciosas do LSA, e por todo carinho e apoio nessa caminhada.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Martins Soares por ter cedido tão gentilmente a cepa do fungo *Arthrobotrys oligospora* para este trabalho.

A professora Solange Samarão por me ajudar sempre com muita boa vontade e muito carinho, pelo apoio e pela parceria.

A Nathália Ferreira dos Santos pela amizade que já dura oito anos, pelo apoio a pesquisa, pelas palavras positivas e incentivadoras nessa longa caminhada que trilhamos juntas.

Ao Leonardo Vilquer, pela amizade de anos, apoio e conselhos, e por todo incentivo mútuo, ânimo e força.

A aqueles que mesmo indiretamente contribuíram de alguma forma em minha formação, e merecem a minha lembrança.

A todos, meu sincero obrigada.

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Fungos nematófagos.....	16
2.2 <i>Arthrobotrys oligospora</i> .....	19
2.3 Melaninas: classes, estrutura e formação .....	22
2.4 Triciclazol como inibidor da melanogênese.....	28
2.5 Tolerância aos estresses ambientais.....	28
2.6 <i>Panagrellus spp</i> .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	31
3.1. Objetivos Específicos.....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Produção de <i>Arthrobotrys oligospora</i> .....	31
4.2. Obtenção dos conídios e conidióforos.....	32
4.3. Proteção das condições ambientais adversas .....	32
4.3.1. Interação fungo nematoide .....	32
4.3.2. Temperatura .....	33
4.3.3. Radiação Ultravioleta.....	33
4.3.4. Estresse oxidativo.....	33
4.3.5 Estresse anaeróbio <i>in vitro</i> com inóculo ruminal.....	34
4.3.6 Atividade predatória em <i>A. oligospora</i> após incubação <i>in vitro</i> .....	34
4.4. Análise estatística.....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	35
5.1 Avaliação da atividade predatória na interação fungo-nematoide.....	35
5.2 Avaliação do estresse ambiental da Radiação Ultravioleta .....	36
5.3 Análise do estresse oxidativo .....	38
5.4 Análise do estresse após exposição ao calor e ao frio.....	38
5.5 Análise da atividade predatória após incubação <i>in vitro</i> .....	39

<b>6 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig.1-</b> Desenho esquemático do fungo ovicida <i>Pochonia chlamydospora</i> .	Pág. 17
<b>Fig.2-</b> Fungos nematófagos endoparasitos.	Pág. 17
<b>Fig.3-</b> Desenho esquemático mostrando os órgãos de captura de fungos nematófagos predadores.	Pág. 18
<b>Fig.4-</b> Desenho esquemático do fungo predador <i>Arthrobotrys oligospora</i> .	Pág. 20
<b>Fig.5-</b> Modelo esquemático da eumelanogênese. A eumelanina e a feomelanina compartilham algumas etapas da via de síntese.	Pág. 24
<b>Fig.6-</b> As vias regulatórias para produção de feomelanina após a etapa da eumelanogênese.	Pág. 25
<b>Fig.7-</b> Síntese de DHN melanina; malonyl-CoA; acetil-CoA; 1,3,6,8-THN; Scitalona; 1,3,6,-THN; Vermelona; 1,8-DHN; DHN-melanina.	Pág. 26
<b>Fig.8-</b> Esquema do processo de formação das neuromelaninas.	Pág. 27
<b>Fig.9-</b> Captura e infecção: taxa de predação durante a interação fungo-nematoide.	Pág. 36
<b>Fig.10-</b> Crescimento micelial analisado em 4 dias	Pág. 37
<b>Fig.11-</b> Crescimento micelial analisado em 8 dias	Pág. 37
<b>Fig.12-</b> Comparação dos tratamentos com a adição dos esporos tratados com peróxido de hidrogênio.	Pág. 38
<b>Fig.13-</b> Comparação do crescimento das UFC's tratadas com L-DOPA, Triciclazol e controle na temperatura de -20°C.	Pág. 39
<b>Fig.14-</b> Estresse anaeróbio <i>in vitro</i> com inóculo ruminal no tempo 0H.	Pág. 40
<b>Fig.15-</b> Estresse anaeróbio <i>in vitro</i> com inóculo ruminal no tempo 12H.	Pág. 40
<b>Fig.16-</b> Estresse anaeróbio <i>in vitro</i> com inóculo ruminal no tempo 24H.	Pág. 41
<b>Fig.17-</b> Estresse anaeróbio <i>in vitro</i> com inóculo ruminal no tempo 36H.	Pág. 41
<b>Fig.18-</b> Estresse anaeróbio <i>in vitro</i> com inóculo ruminal no tempo 48H.	Pág. 42

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- L-DOPA** - L-3,4-dihidroxifenilalanina
- DHN**- 1,8-di-hidroxinaftaleno
- DHI**- 5,6-dihidroxiindole
- TRP**- Tirosinase
- DHICA**- 5,6- dihidroxiindole-ácido-2-carboxílico
- TRP1**- Tirosinase associada a uma proteína do tipo 1
- TRP2**- Tirosinase associada a uma proteína do tipo 2
- L-cisteína** - ácido (R) -2-amino-3-sulfanil-propanoico
- THN**- 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno
- PKS**- Policetídeo sintase
- CoA** – Coenzima A
- THN4**- 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno
- GDHB**- glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno
- DCT**- DOPAcromo tautomerase
- ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio
- T** – Triciclazol
- C** – Controle
- LD** – L-DOPA
- P** – Peróxido de Hidrogênio
- UV**- Radiação ultravioleta
- BDA**- Ágar batata dextrose
- MM**- Meio mínimo
- SDA**- Sabouraud dextrose ágar
- LC** - locus coeruleus ou cerúleo
- B.O.D** – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- UFC** - Unidade Formadora de Colônia
- F1** – esporos tratados com L-DOPA
- F2** – esporos tratados com triciclazol
- F0** – esporos crescidos em SDA sem adição de tratamento

## RESUMO

Melaninas são heteropolímeros formados pela polimerização de compostos fenólicos e indólicos e presentes em todos os reinos biológicos. Dentre suas principais funções se destacam a proteção contra a radiação UV, respostas à danos traumáticos, ao estresse oxidativo, extremos de temperaturas e pressão, e a participação na virulência e patogenicidade em muitas espécies de fungos. *Arthrobotrys oligospora* é um fungo nematófago muito estudado para o controle biológico de nematoides gastrintestinais em animais de produção. Dado à escassez de estudos sobre o processo melanogênico e a função desta macromolécula em fungos nematófagos é relevante verificar seu papel na tolerância ao estresse ambiental em *A. oligospora* e sua influência sobre a atividade predatória em larvas infectantes (L3) de nematoides gastrintestinais de ruminantes. Assim, objetivou-se analisar a eficácia de predação por meio dos esporos fúngicos melanizados e não melanizados, sobre a redução das L3 após a passagem pelo trato digestivo dos animais *in vitro*, além da ação protetora contra as condições ambientais de radiação UV, estresse oxidativo e temperatura. Para isto foram utilizados esporos produzidos usando diferentes tratamentos: com a adição do precursor da melanina (L-DOPA), com o inibidor da melanina (triciclazol) e controle. Em seguida, todos os esporos foram submetidos às condições de estresse anaeróbico, oxidativo, de radiação UV e de temperaturas extremas. A taxa de sobrevivência foi calculada dividindo a UFC (unidades formadoras de colônia) obtida após as exposições pela UFC obtida no controle. O estresse anaeróbico *in vitro* foi realizado com inóculo ruminal adicionado ao meio de cultura e sucessivamente a solução com esporos de cada tratamento, seguido de incubação para posteriores análises. Para a interação fungo-nematoide, foi utilizado discos com micélio e conídios colocados em placas com meio de ágar-água com a adição dos tratamentos, seguido de incubação e posteriormente adição de 100 larvas de *Panagrellus* spp. Em relação aos resultados, na interação fungo-nematoide não houve diferença significativa na predação, e os esporos melanizados e não melanizados não resistiram ao teste *in vitro* gastrointestinal. Entre os resultados relacionados aos estresses ambientais, na exposição à radiação ultravioleta, com 8 dias de crescimento, as colônias tratadas com triciclazol foram as mais afetadas, após 45 minutos de exposição. No estresse oxidativo, os esporos com L-DOPA apresentaram maior taxa de UFC do que os esporos tratados com triciclazol. E nas temperaturas extremas, os esporos tratados com L-DOPA e controle obtiveram maior taxa de sobrevivência em -20°C, do que os esporos tratados com triciclazol. A melanina presente neste isolado de *A. oligospora* demonstrou estar associada ao fator de proteção contra radiação UV, estresses oxidativos e temperaturas extremas.

Palavras-chave: *Arthrobotrys oligospora*, fungo nematófago, melanina; controle biológico.

## ABSTRACT

Melanins are heteropolymers formed by the polymerization of phenolic and indole compounds and present across all biological kingdoms. The presence of melanin offers several protective advantages, including against ultraviolet radiation, traumatic damage, oxidative stress, extreme temperatures and pressure. For many species of fungi, melanin also participates directly in the process of virulence and pathogenicity. *Arthrobotrys oligospora* is a nematophagous fungus that has been extensively studied for the biological control of gastrointestinal nematodes in farm animals. Given the scarcity of studies on the melanogenic process and the function of this macromolecule in nematophagous fungi, it is relevant to verify its role in tolerance to environmental stress in *A. oligospora* and its influence on predatory activity in infective larvae (L3) of ruminants. Thus, the objective was to analyze the effectiveness of predation through melanized and non-melanized fungal spores, on the reduction of L3 after passage through the digestive tract of animals in vitro, in addition to the protective action against environmental conditions of UV radiation, oxidative stress, and temperature. For this, spores produced in different treatments were used: with the addition of the melanin precursor (L-DOPA), the melanin inhibitor (tricyclazole), and control. Then, all were submitted to anaerobic, oxidative, UV radiation, and extreme temperature conditions. The survival rate was calculated by dividing the CFU (colony forming units) obtained after exposures to the CFU obtained in the control. In vitro anaerobic stress was performed with rumen inoculum added to the culture medium and successively the solution with spores of each treatment, followed by incubation for further analysis. For the fungus-nematode interaction, discs with mycelium and conidia were placed on plates with agar-water medium with the addition of treatments, followed by incubation and later addition of 100 *Panagrellus* spp. Regarding the results, in the fungus-nematode relationship, there was no significant difference in predation, and the melanized and non-melanized spores did not resist the in vitro gastrointestinal test. Among the results related to environmental stresses, in the UV exposure, in 8 days of growth, the colonies treated with tricyclazole were the most affected, in the longest exposure time (45 minutes), in the oxidative stress the spores with L-DOPA showed higher CFU rate than tricyclazole-treated spores, and at extreme temperatures, L-DOPA-treated and control spores had a higher survival rate at -20°C than tricyclazole-treated spores. The melanin present in this *A. oligospora* isolate has been shown to be associated with a protective factor against UV radiation, oxidative stress, and extreme temperatures.

Keywords: *Arthrobotrys oligospora*, nematophagous fungus, melanin; biological control.

## 1 INTRODUÇÃO

As melaninas são substâncias amorfas formadas através da polimerização de compostos fenólicos e indólicos e estão presentes em todos os reinos biológicos, o que as configuram com um nível de destaque na escala evolutiva (SOLANO, 2014). Os pigmentos de melaninas são muito comuns no reino Fungi, e estas são consideradas como um dos principais elementos relacionados à sobrevivência e resistência, com o aumento do potencial de virulência e patogenicidade para muitas espécies de fungos (ZALAR *et al.*, 2011; CASADEVALL *et al.*, 2012; SOLANO, 2014). Entretanto, a melanogênese está condicionada a ocorrer em fases do desenvolvimento do micélio, na esporulação ou em reações defensivas contra intempéries ambientais (FRANZEN *et al.*, 2008), atuando diretamente na proteção dos indivíduos portadores, o que resulta em uma melhor adaptação desses organismos às condições em que vivem (CRUZ *et al.*, 2018).

Sendo macromoléculas diversas, Nicolaus (1968) classificou os pigmentos escuros (melanina) encontrados majoritariamente na pele, íris, pêlos de animais e cabelos humanos, como eumelaninas e feomelaninas. Eumelaninas são o grupo principal, e tem como características a insolubilidade e sua coloração varia do preto ao marrom, sendo sintetizado a partir da molécula de tirosina ou da 3,4- dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), já as feomelaninas também são sintetizadas a partir da tirosina ou L-DOPA, com adição de L-cisteína, apresenta coloração que varia do vermelho rubro ao amarelo (PLONKA e GRABACKA, 2006; PAULIN, *et al* 2021).

Alomelaninas, outro grupo de melaninas, denotam de um tipo de pigmento não animal resultante da oxidação/polimerização de di-(DHN) ou tetra-hidroxinaftaleno. Podem apresentar coloração que varia do preto ou pardo, e por meio da flavolina podem gerar várias cores de polímeros de DHN-melaninas, ácido homogentísico (piomelaninas), catecois,  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxibenzeno e o ácido 4-hidroxifenilacético. Contém predominantemente hidrogênio, carbono e oxigênio, esta classe de melanina é sintetizada por algas, bactérias, plantas e algumas espécies de fungos (MASON, 1949; MOLINA, *et al.*, 2021).

As neuromelaninas, estão presentes nas células nervosas do cérebro de mamíferos e aves, e nas glândulas suprarrenais. Esse subgrupo das melaninas é encontrado nos seres humanos em maior quantidade, e em menor quantidade nos primatas, podendo ser inexistente em várias outras espécies. As neuromelaninas

apresentam coloração escura e suas partículas possuem feomelanina no interior e eumelanina na região exterior (BUSH, *et al.*, 2006; PAULIN, *et al.*, 2021).

Em mamíferos, a atividade melanogênica está diretamente condicionada a ação da tirosinase sendo a 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN) e L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) as principais vias (YABUUCHI e OHYAMA, 1972). Em microrganismos, a síntese de melanina geralmente ocorre via DHN-melanina, realizada por meio de um substrato de origem endógena, através da 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN) e policetídeos (WHEELER e BELL, 1988) e a via alternativa DOPA-melanina realizada por meio de uma via exógena com a participação de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009). Em fungos, a melanina atua na proteção contra os estresses ambientais que vão desde proteção contra a radiação ultravioleta, raios X, raios gama, além de possibilitar que alguns fungos sejam capazes de absorver a energia das radiações ionizantes (MATTON, *et al.* 2021; PACELLI, *et al.* 2017; ROBERTSON *et al.* 2012). Além disso, a melanina proteger contra a dessecação e o frio intenso, auxilia o fungo na resistência contra os estresses químicos, como em ambientes hipersalinos, metais pesados, enzimas hidrolíticas, e espécies reativas de oxigênio (GORBUSHINA, *et al.*, 2008; PEREZ-DULZAIDES *et al.*, 2018; GARCÍA-RIVERA, *et al.*, 2001; JACOBSON e TINNELL, 1993).

Na maioria das espécies de fungos, os precursores DHN e L-DOPA, são separados, oxidados e expressados na parede celular do fungo melanizado (FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2014). A deposição da melanina na parede celular do fungo pode ocorrer nas regiões mais internas ou externas, como demonstrado com *Candida albicans* em que a melanina se concentra na parte mais externa da parede celular, enquanto que em *Cryptococcus neoformans* a melanina é depositada na região interna da parede celular, em proximidade com a membrana plasmática (EISENMAN e CASADEVALL, 2012).

Nas espécies de fungos *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus fumigatus*, são utilizados os mesmos precursores para a biossíntese de melanina, ou seja, malonil-CoA/acetil-CoA e naftopirona, entretanto através da diferença espectral apresentada pelas cepas mutantes e selvagens, nas suas respectivas vias biossintéticas de melanina demonstraram que melaninas polimerizadas possuíram diferença estrutural e na sua composição (STRYCKER, *et al.*, 2021).

Considerados como um dos maiores predadores de nematoides de vida livre, os fungos nematófagos, são espécies com habilidade de capturar nematoides usando estruturas especializadas em forma de anéis constritores e não constritores, botões adesivos e redes adesivas bi ou tridimensionais (BARRON, 1977; NORDBRING-HERTZ *et al.*, 2006). Em função destas características algumas das espécies tem sido estudadas para o emprego como agente de controle biológico das nematodioses em animais de produção, visto que o parasitismo por nematoides é um dos fatores que inviabiliza a sanidade animal, e o uso de anti-helmínticos, que são o método de tratamento mais utilizado para o controle desse parasitismo, possuem baixa eficácia, devido ao modo de uso inadequado, podendo essa multirresistência, estar associada com baixa dosagem e a rápida rotação de alguns princípios ativos químicos como é o caso da Ivermectina (SANTOS, 2008; GARCEZ, 2021; ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2021).

Esporos ou hifas de fungos nematófagos são estudados como agentes anti-helmínticos por meio da administração oral em animais, dessa forma, durante o forrageio os esporos e hifas passam pelo sistema digestivo dos ruminantes permanecendo inertes, sem causar dano ao animal (BUZATTI *et al.*, 2015). Após passagem pelo trato digestivo, o fungo germina nas fezes conjuntamente a evolução dos ovos de nematoides até L3 e deste modo o fungo atua na captura, paralisação e predação das larvas, ocasionando a redução quantitativa dessas no bolo fecal (SANTOS, 2008).

O uso dos produtos comerciais a base de fungo nematófago como é o caso do GhenVet e o Bioworma (<https://www.bioworma.com/>), se dá por meio de sua incorporação à ração animal e tem como alvo as formas larvares presentes no bolo fecal (HEALEY, 2018; BRAGA *et al.*, 2020). Devido a forma de administração do produto ser via oral, em conjunto com a ração animal, é importante aos isolados fúngicos a manutenção da atividade predatória após a passagem pelo estresse digestivo. Em estudos recentes Freitas *et al.* (2019) demonstraram que a atividade predatória de isolados do fungo nematófago *D. flagrans*, tratados com triciclazol (inibidor da melanogênese), foi afetada drasticamente, após serem submetidos ao estresse anaeróbico *in vitro* com inóculo ruminal de ovinos. E concluíram que a deposição das partículas de melanina na parede celular do fungo pode ter sido responsável pela manutenção da habilidade predatória após o estresse ruminal anaeróbico.

Nesse contexto, recentemente realizamos a síntese e caracterização da melanina em *A. oligospora* e demonstramos que o mesmo produz eumelanina com deposição na superfície externa a parede celular fúngica (SILVA, 2019). Assim, buscou-se a função biológica da melanina para este fungo, reconhecendo a necessidade do aprofundamento de estudos complementares em outras espécies de fungos nematófagos, para que se possam elucidar novos caminhos para uma melhor compreensão de como esta molécula milenar pode atuar de forma efetiva nos processos biológicos e sobre as situações de estresse a que estes fungos são submetidos, afim de encontrarmos um potencial isolado para ser utilizado como controlador biológico de nematoides em animais de produção.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Fungos nematófagos**

Os fungos nematófagos pertencem a um grupo diverso de fungos que utilizam estruturas especializadas para captura de nematoides (HERRERA-ESTRELLA *et al.*, 2016) dentre os quais, foram descritas mais que 700 espécies que estão distribuídas nos mais variados grupos filogenéticos, tais como os filos Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Chytridiomycota (LI *et al.*, 2015).

São classificados pela sua morfologia e por suas características funcionais que estão associadas à produção de estruturas especializadas para a captura de nematoides. Estão divididos em três grupos: os ovicidas, que atuam nos ovos, através da penetração da hifa na casca do ovo (Fig. 1); os endoparasitas, que atuam na fase larval e em adultos através da ação dos conídios adesivos ou que necessitam ser ingeridos (Fig. 2); e os predadores, que agem formando estruturas ao longo das hifas especializadas em capturar os nematoides (Fig. 3) (BARRON, 1977).



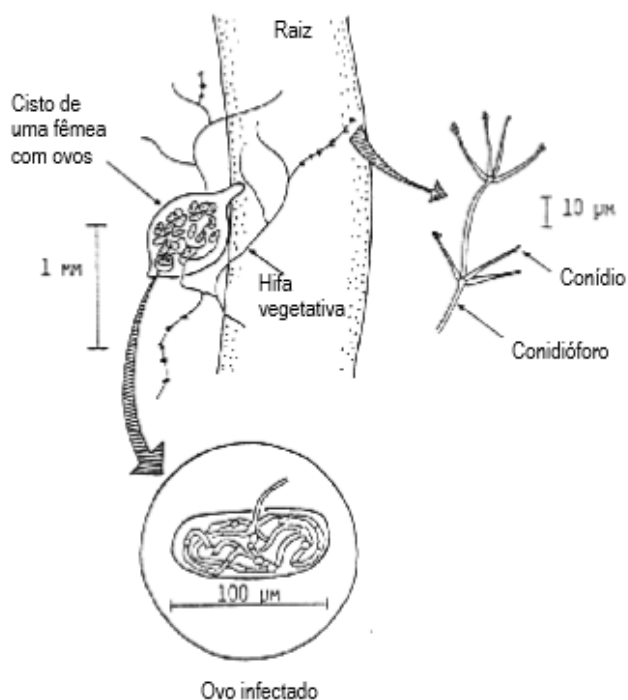


Figura 1 - Desenho esquemático do fungo ovicida *Pochonia chlamydospora*. O cisto, isto é, fêmeas mortas está repleto de ovos e se fixa na raiz. Alguns desses ovos foram infectados pela hifa vegetativa, que penetra a parede cística e, em seguida, a casca do ovo. Também representado um conidióforo com seu conídio (adaptado de FAO, 1998).

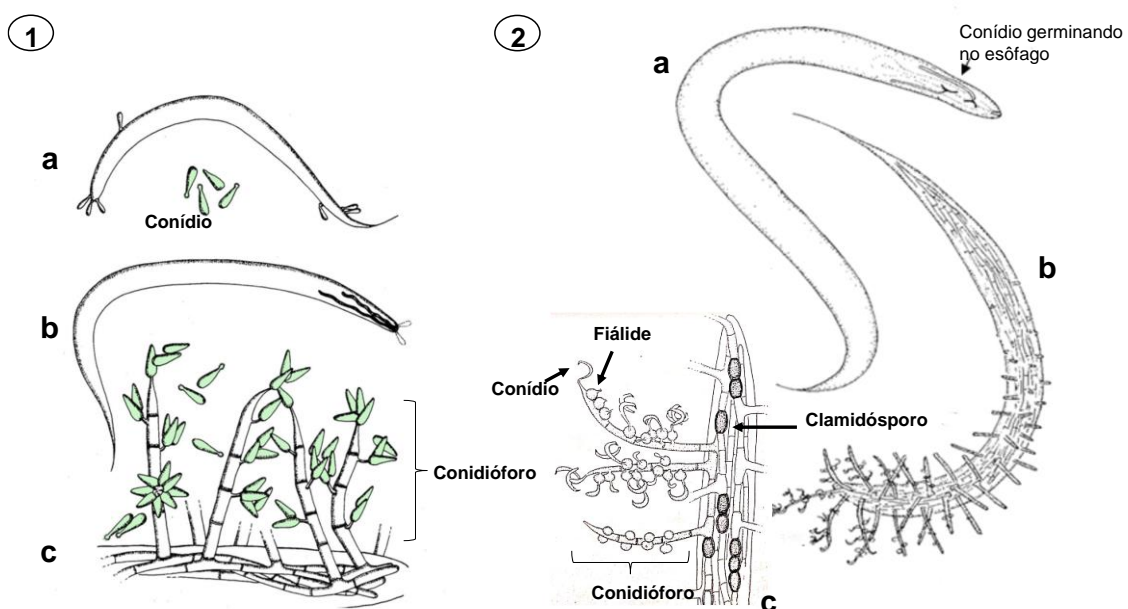


Figura 2 - Fungos nematófagos endoparasitas. Na imagem 1 temos *Drechmeria coniospora*, como exemplo de fungo que produz esporos adesivos, (a): conídios adesivos aderidos a superfície corporal de um nematoide e conídios maduros apresentando botão adesivo numa das extremidades, (b): conídio após germinação e apresentando uma hifa sinuosa no interior corporal do nematoide, (c): detalhe de conidióforos e conídios através da parede corporal do nematoide. Na imagem 2 temos

*Harposporium anguillulae*, (a): Nematóide num estágio da infecção inicial, podendo ser observado o esporo germinando no esôfago do hospedeiro, (b): nematóide num estágio mais adiantado do processo de infecção, sendo visível hifas no interior corporal do hospedeiro e hifas emergindo pela parede corporal do nematóide para formação dos conidióforos, (c): detalhe de hifas no interior corporal do hospedeiro, algumas células envelhecidas já diferenciadas em clamidósporos. Visível ainda conidióforos, fiálide e conídios (adptado de Barron, 1977).

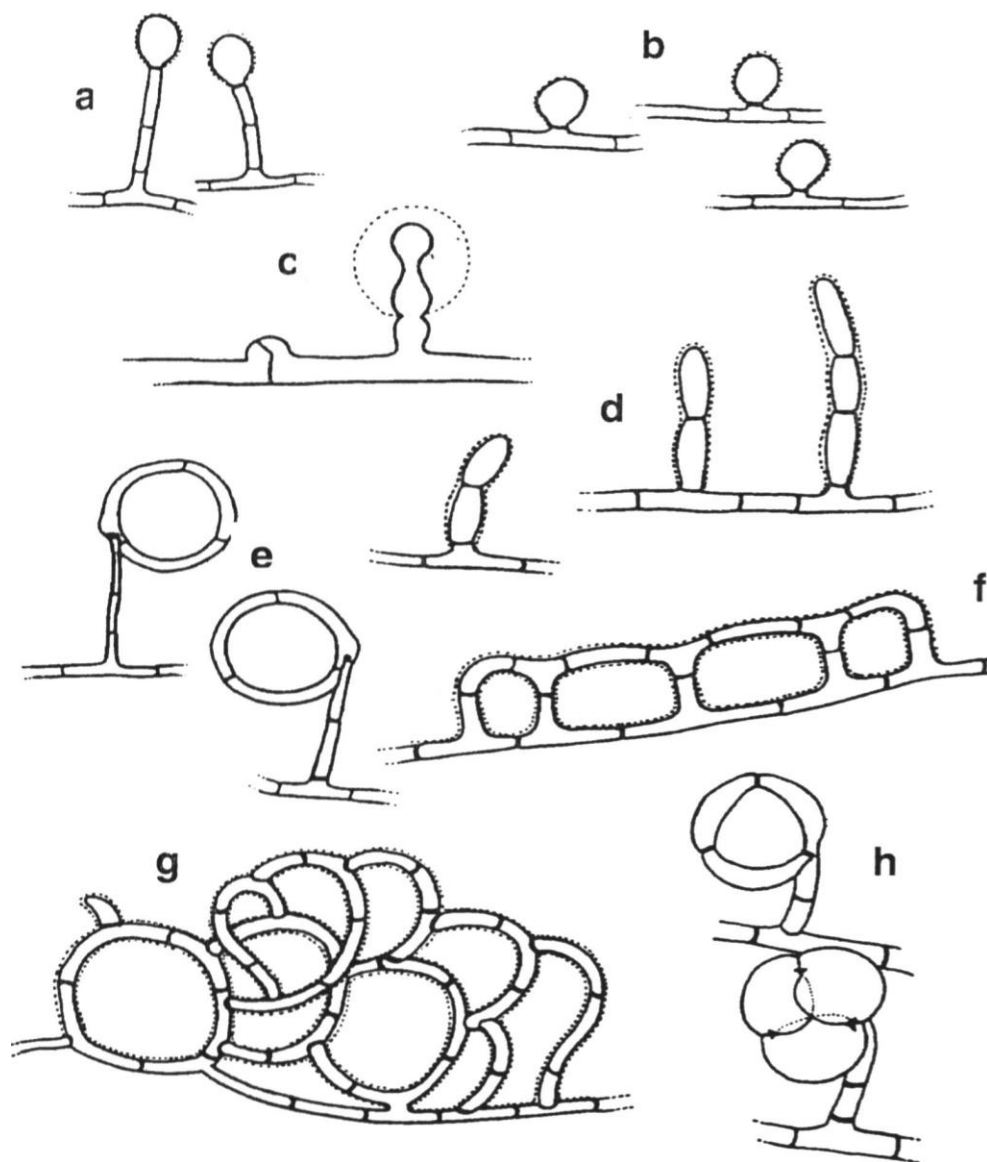


Figura 3 - Desenho esquemático mostrando os órgãos de captura de fungos nematófagos predadores: a) botões adesivos pedunculados; b) botões adesivos sésseis; c) botão adesivo; d) hifas adesivas; e) anéis não-constritores; f) hifa adesiva bidimensional; g) hifa adesiva tridimensional; h) anéis constritores (adaptado de Barron, 1977).

O gênero *Arthrobotrys*. sp pertence ao grupo dos fungos nematófagos predadores, que produzem diversos tipos de armadilhas como: as hifas adesivas,

hifas ramificadas, hifas adesivas tridimensionais e anéis constritores entre outros (ARAÚJO *et al.*, 2004).

Estudos filogenéticos demonstram que os mecanismos envolvidos na construção das armadilhas estão ligados a duas linhagens distintas de fungos, sendo um grupo eficiente no desenvolvimento de anéis constritores e outro em armadilhas com ramificações adesivas (YANG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2020).

Alguns estudos sugerem que os fungos nematófagos possam ter evoluído de fungos celulolíticos e lignolíticos (BARRON, 1992) como uma possível resposta as deficiências de nutrientes em habitats com déficits nutricionais, consumindo os nematoides como fonte de nitrogênio durante seu crescimento em substratos que contém grande quantidade de carboidratos, sendo capaz assim de utilizar a celulose e outros polissacarídeos como fonte de carbono (NORDBRING-HERTZ *et al.*, 2006).

Os principais fungos nematófagos estudados para o controle biológico de nematoides gastrintestinais de ruminantes são os gêneros: *Arthrobotrys* (TUNLID E JANSSON, 1991; GRØNVOLD *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2013), dos quais *A. oligospora* (FRESENIUS, 1850) e *A. musiformis* (DRECHSLER, 1937); o gênero *Duddingtonia*, *D. flagrans* (DUDDINGTON, 1955) e o gênero *Monacrosporium*, representados principalmente por *M. thaumasium* (DRECHSLER, 1937), *M. sinense* (LIU E ZHANG, 1994) e *M. haptotylum* (LIU E ZHANG, 1994) se destacam (BRAGA *et al.*, 2008).

Dentre as espécies de fungos acima citadas para o controle biológico, temos a possibilidade de empregar para o controle biológico de nematoides, o uso de apenas uma espécie de fungo nematófago, ou, as aplicações combinadas, que utilizam diferentes espécies de fungos em conjunto, ou ainda, fungos nematófagos com alguns controles químicos ou extratos de plantas que contenham propriedades anti-helmínticas. Algumas associações se mostraram eficazes e seguras, como é o caso do extrato da *Calluna vulgaris* e os clamidósporos do *Duddingtonia flagrans* (LI, *et al.*, 2022; MAURER, *et al.*, 2022).

## **2.2 *Arthrobotrys oligospora***

O fungo *A. oligospora* (teleomorfo *Orbilia auricolor*) (FRESENIUS, 1852) foi descoberto na Europa por Georg Fresenius, mas apenas em 1888 Friedrich Wilhelm Zopf caracterizou detalhadamente o comportamento predatório desta espécie,

descrevendo o processo de captura de nematoides pelo fungo por meio da utilização de estruturas de rede produzidas pelo fungo (DRECHSLER, 1937).

A espécie *A. oligospora*, classificada de acordo com (BARRON, 1977) na divisão *Ascomycota*, classe *Leotiomycetes*, ordem *Helotiales* e família *Orbiliaceae*, faz parte de um grupo seletivo de microrganismos que utilizam estruturas especializadas para a captura de presas (Fig. 4) (HERRERA-ESTRELLA *et al.*, 2016). Espécies que compõem este grupo são classificadas como fungos predadores, isto é, atacam nematoides utilizando hifas diferenciadas como redes, nódulos e ramos adesivos, anéis constritores e não constritores (Fig. 3). Além deste grupo os fungos nematófagos incluem os fungos endoparasitos, que predam por meio de esporos adesivos ou que necessitam serem ingeridos pelo hospedeiro (Fig. 2) e fungos ovícidas, que colonizam ovos com facilidade, consumindo todo o conteúdo presente em seu interior (Fig. 1) (BRAGA *et al.*, 2008).

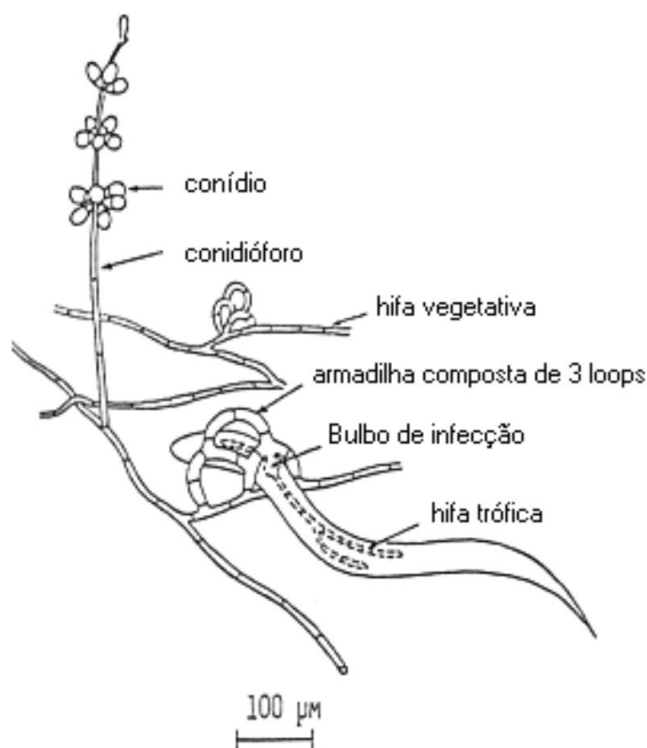


Figura 4 - Desenho esquemático do fungo predador *Arthrobotrys oligospora*. O nematoide é capturado pela armadilha, formada por três laços. No interior do hospedeiro, o fungo gera um bulbo infeccioso no qual a hifa trófica cresce, e preenche o corpo deste. O conídio é formado em cachos em intervalos ao longo do comprimento do conidióforo ereto (adaptado de FAO, 1998).

*Arthrobotrys oligospora* foi o primeiro fungo nematófago cujo genoma e proteoma foram sequenciados, e de acordo com o resultado obtido através da análise comparativa, foi identificado em seu genoma uma alta parcela de genes

relacionados à patogenicidade, o mesmo não ocorreu na análise comparativa do genoma da espécie *Drechlerella stenobrocha*, onde havia menos genes de lectina relacionados com o contato fungo-nematoide, sugerindo dessa forma, que, diferentes espécies de fungos nematófagos podem ter um mecanismo diferente de formação de armadilhas (YANG, *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2022).

Por possuírem ampla distribuição, sendo o fungo nematófago mais comumente encontrado, *A. oligospora* pode se adaptar e crescer em diversos ambientes, além de ser considerado um predador facultativo podendo utilizar os nematoides como fonte de nitrogênio ou assumir caráter saprotrófico, absorvendo nutrientes de materiais orgânicos em decomposição (MO *et al.*, 2008; SAXENA, 2008; WACHIRA *et al.*, 2009; JANSSON E LOPEZ-LLORCA, 2004; COOKE, 1963; BARRON, 1992; DUDDINGTON *et al.*, 1972).

Com relação a sua morfologia, esta espécie de fungo, possui conidióforos alongados, delgados, simples, septados e hialinos, sendo ligeiramente dilatados na região do ápice e na formação de esporos. As regiões de crescimento dos conídios são formadas simpodialmente, e os conídios possuem coloração hialina, são bicelulares e as células apresentam tamanhos desiguais, a menor fica mais próxima da extremidade do conidióforo, apresentam formato oval e oblongo (van OORSCHOT, 1985).

Ambientes ricos em nematoides induzem a formação de armadilhas de rede adesiva por *A. oligospora*, dessa forma, o fungo entra na sua fase parasitária e ocorre a captura e predação dos nematoides, contudo, os nematoides não são os únicos capazes de estimular, o desenvolvimento e a formação de armadilhas nesta espécie de fungo, pois, ambientes com baixo teor nutricional, também são capazes de favorecer a morfogênese das hifas especializadas em *A. oligospora* (NORDBRING-HERTZ, 2004).

O fungo *A. oligospora* possui alta capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, além de sua habilidade e eficiência na predação dos nematoides, e produzir hifas especializadas em redes e anéis adesivos, para formar armadilhas de captura, sendo o fungo nematófago mais facilmente encontrado onde há maior incidência de nematoides. Essas características fazem dele um promissor agente biocontrolador (HASHMI e CONNAN 1989; GRØNVOLD *et al.* 1993; BIRD e HERD 1995; CHANDRAWATHANI *et al.*, 1998; JAFFEE 2004; YAN *et al.* 2011).

### 2.3 Melaninas: classes, estrutura e formação

A palavra melanina é originada do grego “melanos” que significa “escuro”, esta terminologia, foi utilizada inicialmente em 1840 pelo médico-químico sueco Jacob Berzelius. Ele extraiu um pigmento de cor escura da membrana dos olhos de mamíferos, o qual foi denominado de melanina (D’ISCHIA *et al.*, 2013).

E recentemente, evidências fósseis, dataram melaninas encontradas em vertebrados há mais de 300 milhões de anos, essas novas descobertas estão ampliando o entendimento sobre a diversidade e funcionalidade das melaninas ancestrais em vertebrados, sendo encontradas em biomateriais não mineralizados como tecidos moles e em penas fósseis preservadas por eumelanossomos (MCNAMARA *et al.*, 2021; PRADO, 2017).

Na década de 1960, na Universidade de Nápoles, Rodolfo Nicolaus concentrou sua pesquisa ao tentar compreender a estrutura das melaninas, pois os pigmentos pretos pareciam estar distribuídos em quase todos os níveis da escala filogenética sendo estes responsáveis pela vasta variedade de cores de pele, cabelos e olhos encontrados na pigmentação racial humana (PROTA, 2000). Sendo assim, Nicolaus (1968) inicialmente classificou as melaninas como eumelaninas e feomelaninas, sendo estas encontradas na pele, íris e cabelos; e em alomelaninas sintetizadas em plantas e algumas espécies de fungos. Porém, recentemente esta classificação recebeu a inclusão da classe das neuromelaninas, presentes apenas nas células nervosas (MAGARELLI, *et al.*, 2010).

As melaninas são um grupo de pigmentos complexos formados por compostos fenólicos que possuem um alto peso molecular, geralmente insolúveis, com características hidrofóbicas possuindo domínios indólicos como base estrutural, ligadas covalentemente em estruturas desemparelhadas e unidas por interações do tipo Van de Waals (FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2014). Por se tratar de uma substância amorfa, e seu tamanho relativamente grande, as melaninas são insolúveis em solventes aquosos ou orgânicos, apresentam grande heterogeneidade, o que as tornam substâncias muitas vezes, difíceis de serem classificadas ou completamente definidas (EISENMAN E CADASEVALL, 2012).

Em mamíferos, a atividade melanogênica está condicionada pela ação de uma enzima denominada tirosinase (YABUUCHI E OHYAMA, 1972). Nos microrganismos a síntese de melanina geralmente ocorre via DHN-melanina, realizada por meio de um substrato de origem endógena, através da 1,8-di-

hidroxinaftaleno (DHN) e policetídeos (WHEELER E BELL, 1988) e a via alternativa DOPA-melanina realizada por meio de uma via exógena com a participação de L-3,4-dihidroxiifenilalanina (L-DOPA) (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009). Nos fungos, os precursores DHN e L-DOPA, são separados, oxidados e expressados na parede celular do fungo melanizado (FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2014). A deposição da melanina na parede celular do fungo pode ocorrer nas regiões mais interna ou externa, isto irá variar de acordo com a espécie. Em *Candida albicans*, a melanina se concentra na parte externa da parede celular, enquanto que em *Cryptococcus* a melanina se encontra na região interna da parede celular, em proximidade com a membrana plasmática (EISENMAN E CASADEVALL, 2012).

O fungo nematófago *A. oligospora* expressa tirosinase (MEERUPATI, *et al.*, 2013). Esta enzima citosólica apresenta-se associada aos processos de produção e estabilidade de esporos, a manutenção dos processos de defesa e aumento da virulência, reestruturação de tecidos após impactos traumáticos, e no emprego da pigmentação em determinadas espécies fúngicas, demonstrando assim, estar envolvida nos processos ativos da melanogênese nos fungos, desde a síntese à manutenção de melanina (HALAOULI, *et al.*, 2006).

A reação da biossíntese da eumelanina (Fig. 5) é formada por uma série de ciclização, levando a formação de monômeros indólicos intermediários denominados DOPACHROMO que sofrem uma descarboxilação para formar compostos como 5,6-dihidroxiindole (DHI) e também pode sofrer catálise pela enzima tirosinase do tipo I e II (TRP2 e TRP1) para produzir 5,6-dihidroxiindole-ácido-2-carboxílico (DHICA) e finalmente serem oxidados para formar eumelanina (SOLANO, 2014).

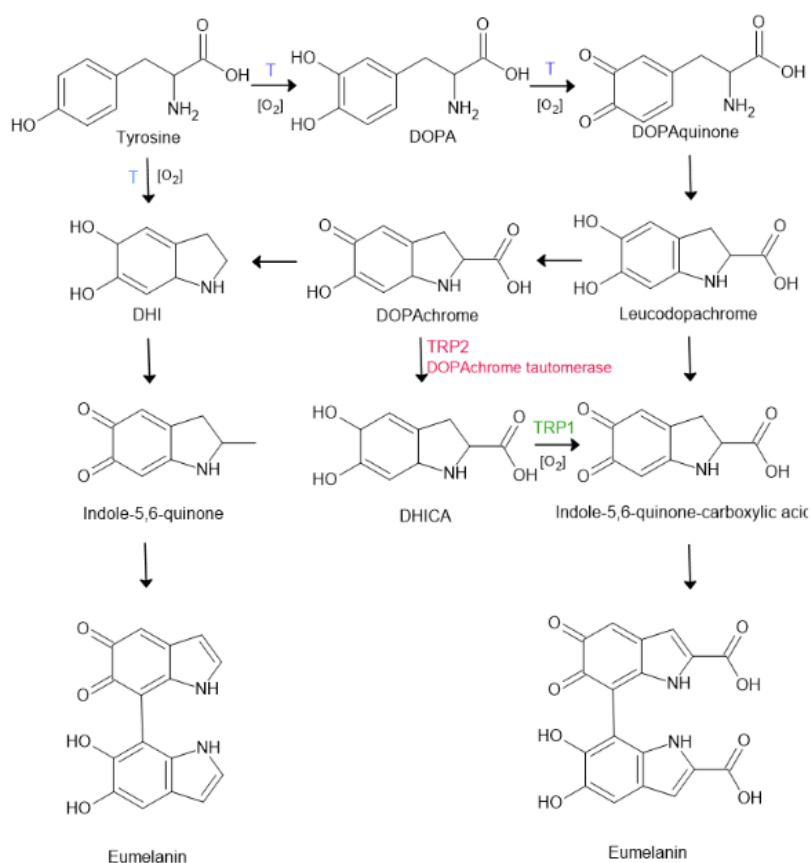


Figura 5 - Vias da eumelanogênese. T- tirosinase; TRP1- tirosinase associada a uma proteína do tipo 1 (DHICA oxidase); TRP2- tirosinase associada a uma proteína do tipo 2 (DOPAchrome tautomerase); DOPA-3,4-dihidroxifenilalanina; DHI- 5,6-dihidroxiindole; DHICA- 5,6-dihidroxiindole-ácido-2-carboxílico. Fonte: Plonka e Grabacka, 2006.

As feomelaninas são biopolímeros solúveis em soluções alcalinas, formados por unidades de benzotiazinas, e são sintetizadas inicialmente como eumelaninas, derivadas de uma DOPAquinona, entretanto, na síntese de feomelanina (Fig. 6), a atividade e a expressão da enzima tirosinase é diminuída (BARBER *et al.*, 1985), e os tióis assumem o papel da tirosinase para realizar a cisteinização da DOPAquinona por meio da cisteína em cisteinilDOPA ou por intermédio da glutatona em glutationilDOPA (KOBAYASHI *et al.*, 1995). Posteriormente, este produto sofre uma cascata de reações até ocorrer a polimerização para produzir alguns derivados de benzotiazina (5-hidroxi-1,4-benzotiazinilalanina) que resulta na formação de macromoléculas de alto peso molecular conhecidas como feomelaninas (CHANG, 2009).

As feomelaninas exibem coloração vermelha ou amarela, apresentam o heteroátomo nitrogênio em sua estrutura e também o enxofre, além de conter grupos



carregados negativamente, que podem estar associados a ligação eletrostática de cátions, e a redução da interação com o pH (MARS E LARSSON, 1999).

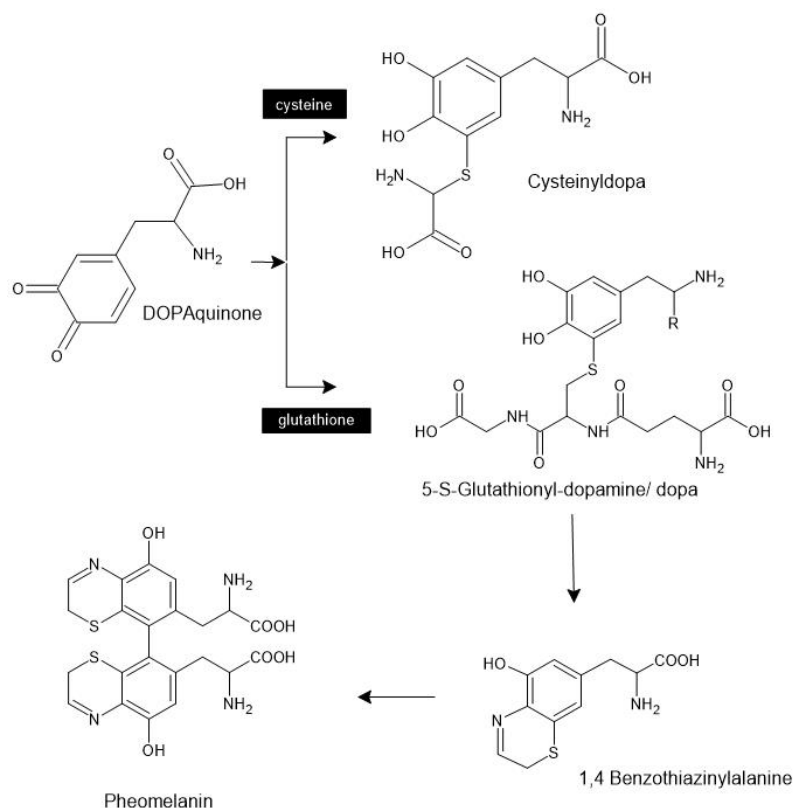


Figura 6 - Síntese de feomelanina após a etapa da eumelanogênese. Durante a feomelanogênese a glutatona ou a cisteína assumem a função da tirosinase que tem sua atividade e expressão reduzida e convertem DOPAquinona em CisteinildOPA e derivados de Benzotiazina para a produção de Feomelanina. Fonte: Chang (2009).

As alomelaninas são caracterizadas por apresentarem cores que vão do preto ao marrom-escuro. Fazem parte de um grupo heterogêneo que possuem polímeros que não contêm o heteroátomo nitrogênio e estão presentes em plantas e algumas espécies de fungos (DE ANGELIS *et al.*, 1996).

A síntese da DHN-melanina (Fig. 7) ocorre a partir dos precursores acetil-CoA ou malonil-CoA, que são convertidos pela poliketídeo sintase (PKS) em 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN), o qual é então reduzido pela ação da enzima catalisadora THN redutase para a produção de scitalona (LEE *et al.*, 2019). Por vias enzimáticas scitalona é desidratada gerando 1,3,8-tri-hidroxinaftaleno, que sofre redução formando vermelona, e etapas posteriores de desidratação catalisadas pela scitalona desidratase formam o 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) (LANGFELDER *et al.*,

2003). Surpreendentemente alguns subprodutos gerados durante a síntese de DHN-melanina, o naftaleno e a decalina apresentaram propriedades antibacterianas e também imunossupressoras (SAKEMI *et al*, 1995).

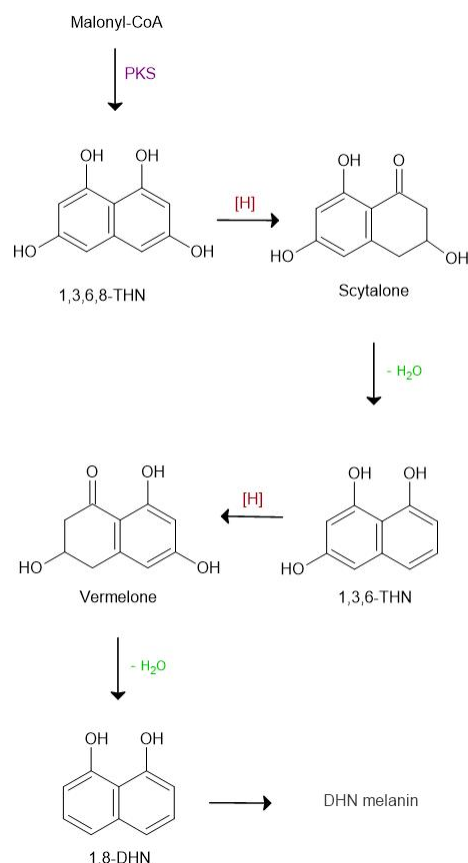


Figura 7 - Síntese de DHN melanina. PKS- poliketídeo sintase; 1,3,6,8-THN- 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno; 1,3,6-THN-1,3,6-trihidroxinaftaleno; 1,8-DHN-1,8-dihidroxinaftaleno. Fonte: Plonka e Grabacka, 2006.

As neuromelaninas são produzidas quimicamente pela oxidação das catecolaminas (Fig. 8), dopamina e epinefrina, sendo localizada na “mancha azul”, *locus coeruleus* (LC) no cérebro (WAKAMATSU, *et al.*, 2003). O principal núcleo noradrenérgico apresenta uma cor azul acinzentada por causa da presença dos grânulos de neuromelaninas no interior do citoplasma celular (FEDOROW, 2005). Em algumas doenças neurodegenerativas, se observa a perda do pigmento melanina no núcleo do cérebro, e em consequência disso, há uma redução dos neurônios dopaminérgicos específicos, como por exemplo, é o caso do Mal Parkinson (URÁN E CANO, 2011).

A formação das neuromelaninas está intrinsicamente ligada ao potencial efeito protetor, evitando o acúmulo de quinonas originadas pelo processo de oxidação de neurotransmissores das catecolaminas presentes no citosol (SULZER *et al.*, 2000). As neuromelaninas possuem alta capacidade de atração pelos íons metálicos, reduzindo desta forma possíveis fontes de toxicidade (FERRARI *et al.*, 2017). Os grânulos de neuromelanina apresentam conformação amorfa e variação de tamanho podendo ser de 0,5 a 2,5  $\mu\text{m}$ , podem ser facilmente visualizados tanto macroscopicamente quanto por meio de microscópio de luz como um pigmento de cor escura (FERRARI *et al.*, 2017). Apesar dos mecanismos de produção de algumas outras classes de melaninas estarem de certo modo elucidados, os mecanismos que levam a neuromelanogênese ainda não estão muito bem esclarecidos. No processo de síntese das melaninas periféricas a regulação ocorre através de enzimas, entretanto, o processo de formação das neuromelaninas, não é enzimaticamente controlado, pois não ocorre expressão da enzima tirosinase no cérebro (DOUBLE *et al.*, 2008; IKEMOTO *et al.*, 1998; CAO *et al.*, 2021).

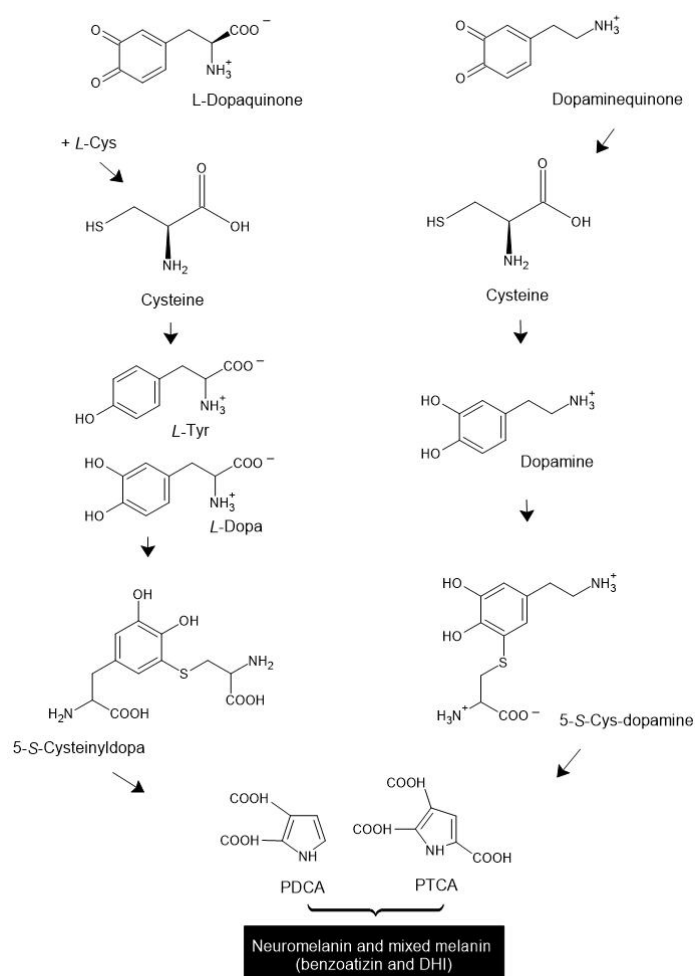


Figura 8. Síntese das neuromelaninas. A biossíntese das neuromelaninas ocorre no citosol, através do acúmulo de catecolaminas que são oxidadas para L-Dopaquinona e Dopaminaquinona, essas quinonas reagem com cisteína (Cys), para formar 5-S-cisteinildopa (5-S-Cys-DOPA) através da oxidação de L-DOPA e e 5-S-cisteinildopamina (5-S-Cys-DA) com subsequente formação de resíduos como pirrol-2,3-dicarboxílico ácido (PDCA) e ácido pirrol-2,3,5-tricarboxílico (PTCA) por oxidação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fonte: (Wakamatsu *et al.* 2003; Zecca *et al.* 2001)

## 2.4 Triciclazol como inibidor da melanogênese

Os inibidores da biossíntese de melanina tem sido utilizados para elucidar a compreensão dos processos e do papel da melanina em determinadas espécies de fungos (KOEHLER, 2019; ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009; FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2014), e dentre os quais, destaca-se o triciclazol (5-metil-1,2,4-triazol-3,4-b-benzotiazol) que atua diretamente nas células inibindo a ação da THN redutase (tri-hidróxi-naftaleno-redutase), reduzindo a concentração de metabólitos intermediários gerados durante a melanogênese (TOKOUSBALIDES e SISLER, 1979).

Diversos estudos realizados, demonstraram que a utilização destes inibidores nas colônias fúngicas inibiu o desenvolvimento da pigmentação escura nas culturas estudadas, comprovando a inibição da síntese de melanina (FRANZEN *et al.*, 2006; BRUNSKOLE SVEGELJ *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2019; BERTHELOT *et al.*, 2020).

## 2.5 Tolerância aos estresses ambientais

As melaninas formam estruturas com capacidades físico-químicas únicas, como o paramagnetismo, absorção óptica, transporte de cargas, além de possuírem uma estrutura estável. Essas características próprias permitem que as melaninas desempenhem diversos papéis em diferentes sistemas biológicos e o processo de melanização se constitui como um mecanismo de defesa geral em resposta adaptativa frente às mudanças climáticas (CORDERO e CASADEVALL, 2017). Estudos sugerem que a deposição dos grânulos de melanina em fungos tenha efeito termoprotetor, auxiliando na sobrevivência dos fungos nas temperaturas extremas de calor e frio (ROSAS e CASADEVALL, 1997).

Nas regiões desérticas, a amplitude térmica diária é extremamente alta, podendo no período diurno alcançar temperaturas maiores que 50°C, e durante o período noturno, temperaturas extremas negativas, que podem ser menores que -20°C. Embora o deserto seja um ambiente homogêneo e a fauna não seja tão

diversificada devido suas próprias características que tornam o ecossistema desértico um lugar seletivo, organismos denominados “fungos pretos” habitam as rochas desérticas do Arizona e da Antártica (STALEY *et al.*, 1982; FRIEDMANN *et al.*, 1987; STERFLINGER, 2012, SELBMANN *et al.*, 2005). Estes fungos apresentam diversas características em comum, dentre elas destacam-se a alta melanização, parede celular espessa e com multicamadas, além da produção de exopolissacarídeos, o que confere a estes fungos uma extraordinária habilidade de resistência aos estresses físicos e químicos encontrados nestes ambientes (STERFLINGER, 2006).

A biossíntese de melaninas em fungos é frequentemente relacionada a patogenicidade uma vez que, fungos patogênicos necessitam de mecanismos associados ao aumento de sua sobrevivência, para minimizar os efeitos do estresse ambiental, como irradiação e dessecação, que podem surgir em meio a um ambiente hostil, pois, quando ocorre a invasão fúngica em um hospedeiro, o fungo patogênico deve ser capaz de criar resistência aos mecanismos de defesa lançados pelo hospedeiro (ZHDANOVA *et al.*, 2000). Alguns estudos demonstraram que os conídios melanizados da espécie *Sporothrix schenckii*, foram menos suscetíveis a morte por irradiação ultravioleta (UV) sendo também resistentes a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, deste modo, nota-se a importância da atuação da melanina na proteção das células contra agentes químicos e físicos, e na redução dos efeitos gerados por radicais livres (ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000).

Outras espécies de fungos, como *Curvularia* spp e *Alternaria* spp., se demonstraram altamente resistentes a radiação gama ionizante (SALEH *et al.*, 1988), o que sugere que a melanina atue na absorção de energia, tendo propriedades semicondutoras, quelantes e de ligantes, por ser absorver vários tipos de energia eletromagnéticas e dissipa-las de diferentes formas, também é capaz de absorver íons metálicos, radicais livres, compostos orgânicos, e até drogas (SOLANO, 2017; CORDERO e CASADEVALL, 2017).

Singaravelan *et al.* (2008) demonstraram que a pigmentação da melanina nos esporos e micélios fúngicos, desempenham um papel fundamental para a proteção contra UV quando analisaram a diferença entre as regiões do lado sul do Monte Carmel, em Israel, que recebe em média 200-800% mais radiação solar do que o lado norte, com um clima temperado e sombreado. Eles constataram que a radiação ultravioleta solar além de atuar como um agente de seleção também influenciava na

interação organismo-ambiente, uma vez que os organismos localizados na região sul, com maior incidência de radiação solar, como bactérias, fungos e leveduras, além de apresentarem maior disposição do pigmento melanina, desenvolveram diferentes tipos de adaptações, dentre elas, a resistência a luz ultravioleta.

## **2.6 *Panagrellus* spp.**

Entre os organismos que vivem no solo, os nematoides de vida livre são um dos grupos mais importantes, por serem abundantes, diversos e com uma ampla distribuição, se tornam fundamentais para os mais variados tipos de ecossistemas. *Panagrellus* spp é comumente utilizado em diversos estudos como nematoide modelo, sendo cultivado e mantido em diversos laboratórios ao redor do mundo. Dentre as suas utilizações, podemos mencionar: servir de isca para isolamento de fungos, e testes de captura e predação de fungos nematófagos e até mesmo para nutrição e alimentação de diversos tipos de peixes (GOMES, *et al.*, 2001; LAVENS e SORGELOOS, 1996)

O gênero *Panagrellus* compreende cerca quinze espécies (FERRIS, 2009; ABOLAFIA *et al.*, 2016; IVANOVA *et al.*, 2018) pertencendo a família Panagrolaimidae e ordem Rhabditida (NADLER, *et al.*, 2006). São organismos vermiformes, com corpo não segmentado, e de coloração hialina, o seu tamanho médio corporal varia entre 1,5 mm e cerca de 50 µm de diâmetro, possui cauda com formato pontiagudo e a cavidade da boca arredondada (STOCK e NADLER, 2006). Geralmente, os nematoides do gênero *Panagrellus* possuem um rápido desenvolvimento, passando por quatro estágios antes de chegar à sua fase adulta (HECHLER, 1970). Esse período de mudanças de estágios, ocorre em cerca de 3 dias de vida, que é o tempo em que alcançam a sua maturidade (SANTIAGO *et al.*, 2003).

As fêmeas são mais numerosas que os machos, e os machos apresentam um tamanho corporal menor e mais delgado em relação ao formato corporal das fêmeas. Sua reprodução ocorre de forma sexuada com altas taxas reprodutivas. São organismos vivíparos com o processo de embriogênese e eclosão ocorrendo dentro do útero (FREITAS, 2017; STEFANELLO *et al.*, 2022).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar como estruturas de resistência (conídios) podem resistir à ação de estímulos físicos e químicos no meio ambiente *in situ* e analisar a possível relação entre o fator de virulência sobre a infecção nas interações fungo-nematoide com a presença e/ou redução da produção de melanina, e a sua tolerância aos estresses contidos no trato gastrointestinal.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Analisar as estruturas de resistência, melanizadas e não melanizadas perante situações de estresse, como temperatura, radiação UV e estresse oxidativo.
- Observar como os conídios e conidióforos tratados com inibidor de melanina triciclazol se comportam ao serem submetidos ao estresse ruminal *in vitro*.
- Avaliar a relação existente entre a produção de melanina pelo fungo e o fator de virulência nas suas relações de predação com a utilização de *Panagrellus* spp. como nematoide modelo.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Produção de *Arthrobotrys oligospora*

Para inibição da biossíntese de melanina foram preparadas placas de Petri em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) utilizando o inibidor de biossíntese de melanina Triciclazol (Sigma® Aldrich, USA), (5-metil-1,2,4-triazol-3,4-b-benzotiazol). Assim, 10 mg do inibidor foram diluídos em 1 mL de etanol e adicionado ao meio de cultura na concentração de 8,16, 32µg/mL. Os cultivados sobre estas condições foram incubados em câmara escura a 27°C por 15 e 30 dias.

E a concentração que obteve melhor resultado para inibição da melanogênese foi de 16 µg/mL, a partir desse dado iniciamos a produção de *Arthrobotrys oligospora* para o experimento.

O isolado de *Arthrobotrys oligospora* cedido pelo grupo (LabNema-Unesp), foi cultivado em placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com a adição de 16 µg/mL de triciclazol (Sigma-Aldrich, USA) ou 1 mM de L-DOPA (Sigma-Aldrich, USA), e o controle, sem a suplementação dessas drogas. As placas foram incubadas por 30 dias em câmara escura para evitar a polimerização da L-DOPA a

27°C a fim de verificar a intensificação da pigmentação de melanina na colônia estudada.

#### **4.2 Obtenção dos conídios e conidióforos tratados com a adição do precursor de melanina L-DOPA e do inibidor triciclazol**

Cada placa de Petri previamente tratada foi lavada com água destilada estéril com o auxílio de uma barra de espalhamento de vidro para desprendimento dos esporos. Em seguida, os esporos em suspensão foram transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL e filtrados em peneira plástica contendo um tecido de nylon com diâmetro de 100 micras. A contagem de esporos foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. Para semeadura dos esporos, foi utilizado meio de cultura Ágar Dextrose Batata (BDA) preparado, utilizando-se 140 g de batatas descascadas e cortadas em cubos, cozidas em 1.000 mL de água destilada por aproximadamente 15 min. No decoto filtrado, adicionou-se 10 g de dextrose e 15 g de ágar e o volume foi completado para 1.000 mL. Esse meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min e, posteriormente, vertido em placas de Petri estéreis, conforme descrito por Bernadi *et al.*, (2005), com pequenas modificações.

#### **4.3 Proteção das condições ambientais adversas em conídios e conidióforos melanizados e não melanizados em meios controlados**

##### **4.3.1 Interação fungo nematoide**

Discos de cultura de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo micélio e conídios foram colocados em placas de Petri contendo meio ágar-água a 2% com adição de 1 mM L-Dopa ou 16 µl de Triciclazol e grupos controle sem fungo ou sem tratamento.

As placas foram incubadas em BOD por 7 dias a 25°C. No final deste período, 100 larvas de *Panagrellus* de nematoide foram adicionadas em cada placas e a contagem realizada após 24 e 48 h de incubação em BOD. Posteriormente, as larvas não predadas foram recuperadas pela Técnica de Baermann e a porcentagem de redução do número de larvas observada, adaptado de Freitas *et al.*, (2019).



#### 4.3.2. Temperatura

Para verificar a hipótese de que a melanina ofereceu proteção às condições de temperatura, cerca de 100 conídios foram suspensos em água destilada e colocados em tubos cônicos tipo eppendorf esterilizados e em seguida submetidos as temperaturas de -20, 38, e 50°C por 24 h, utilizando estufa bacteriológica em temperatura fixa e refrigerador para as temperaturas negativas.

A temperatura foi aferida com termômetro específico. Para as amostras submetidas ao estresse de temperatura negativa, os conídios foram armazenados anteriormente em uma solução de glicerol a 20% e submetidos a - 20°C por 24 h. Após o período de teste, os conídios foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Dextrose Batata (BDA) e incubados em BOD por 24 e 48 h para obtenção das unidades formadoras de colônia (UFC). A taxa de sobrevivência foi calculada dividindo a UFC obtida após a exposição a temperatura pela UFC obtida na temperatura ambiente (controle). Uma amostra testemunha foi mantida em temperatura ambiente para todos os tratamentos, conforme Rosas & Casadevall, (1997), com modificações.

#### 4.3.3. Radiação Ultravioleta

Plugs de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo micélio e conídios foram colocados em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud para tratamento descritos anteriormente (Controle, L-DOPA ou Triciclazol). Os esporos foram expostos a radiação UV 9.55 W.m<sup>-2</sup> por 5, 15, 30 ou 45 minutos. Após cada exposição, os esporos foram incubados em câmara escura à temperatura de 27° C por 4 e 8 dias. Após este período o crescimento micelial foi mensurado com base no raio da colônia conforme (ALLAM *et al.*, 2012), com modificações.

#### 4.3.4. Estresse oxidativo

Para verificar o efeito do estresse oxidativo, suspensões de 100 conídios.mL foram incubadas na presença de 50 mM de peróxido de hidrogênio por 15 minutos à temperatura ambiente (entre 21 e 25°C). Após este período, as mesmas suspensões foram diluídas e semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas em BOD por 24 e 48 h para obtenção das unidades formadoras de colônia (UFC), conforme (ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000) com modificações. Placas contendo conídios que não passaram pelo tratamento foram utilizadas como controle.

#### 4.3.5 Estresse anaeróbio *in vitro* com inoculo ruminal

A metodologia utilizada baseou-se no estudo realizado por (FREITAS, 2019) no qual, as incubações *in vitro* foram realizadas usando frascos de 100 mL contendo solução redutora e meio de cultura preparado conforme descrito por Goering e Van Soest (1970) e contendo inoculo ruminal preparado conforme descrito por Hall e Mertens (2008).

O inoculo ruminal foi obtido a partir de novilhos mantidos a pasto e alimentados individualmente com 1 kg/dia de concentrado de milho e farelo de soja (3:1 com base na matéria seca). Amostras individuais dos conteúdos líquidos e sólidos do rúmen foram coletados, armazenados em garrafas térmicas e enviadas ao laboratório (CEUA - Protocolo nº380). Estas amostras foram misturados em um liquidificador por 60 segundos em uma proporção de 1:2 (sólidos:líquido) a fim de separar bactérias e protozoários aderidos ao sólido, partículas de digesta e obter uma amostra mais representativa da microbiota ruminal.

A mistura foi, em seguida, filtrada por oito camadas de gaze. O inoculo ruminal foi adicionado ao meio de cultura, anteriormente reduzido em uma proporção de 4:1 (cultura reduzida meio:inoculo ruminal), e mantida a 39°C sob infusão de CO<sub>2</sub> constante até a transferência para os frascos lacrados e mantidos em banho-maria a 39°C (HALL E MERTENS, 2008).

Aproximadamente 0,5 g de tifton-85 (*Cynodon nlemfuensis* × *Cynodon dactylon*) foi incubado com 48 mL do meio de cultura contendo o inoculo ruminal e 2 mL da solução contendo os esporos para cada tratamento (L-DOPA, triciclazol e controle). A adição de tifton-85 foi utilizada para evitar o esgotamento dos nutrientes no meio de cultura. Para cada tratamento, foram feitas triplicatas e uma alíquota de 5 mL de cada frasco foram coletados após 0, 12, 24, 36 e 48 h de incubação para posterior análise.

#### 4.3.6 Atividade predatória em *A. oligospora* após incubação *in vitro*.

Amostras fecais foram coletadas diretamente do reto das 10 ovelhas para serem utilizadas no cultivo fecal. As fezes foram completamente homogeneizadas e submetidas à técnica modificada de Gordon e Whitlock (1939) para contagem do número de ovos por grama (EPG) de fezes. As amostras fecais positivas para ovos de nematoides foram utilizadas nos ensaios de atividade predatória. Para obtenção das larvas infectantes (L3), foram feitas as coproculturas e baseadas no método

descrito por Roberts e Sullivan (1950) com as seguintes modificações: 3 g de fezes foram adicionados a copos plásticos descartáveis de 60 mL. Esporos de cada tratamento (L-DOPA, com e sem triciclazol) e tempo (0, 12, 24, 36 e 48 h) foram inoculados individualmente nos copos em doses de 17.500 por mL, aproximadamente. Os copos foram colocados em uma caixa plástica (30 cm de comprimento x 20 cm de largura x 13 cm de altura) contendo 100 mL de água destilada e coberta com filme plástico para evitar perda de umidade durante sete dias de incubação a 27°C. Após o período de incubação, cada copo plástico foi preenchido com água destilada e, em seguida, tampado com uma placa de Petri, e o copo foi invertido. Dez mililitros de água destilada foram adicionados à placa de Petri. Após um período de quatro horas, a água destilada foi pipetada para recuperação de L3 e posterior quantificação dessas larvas. Cada tratamento e tempo teve três repetições. Um grupo controle (sem fungo) também foi testado.

#### **4.4 Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados de temperatura, estresse oxidativo, radiação ultravioleta e predação fungo-nematoide foram obtidas através do programa *GraphPad Prism 4.0* (*Prism Software*, Irvine, CA, USA), demonstrada a normalidade dos dados, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff, foi realizada análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Tukey para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Em todas as análises estatísticas as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

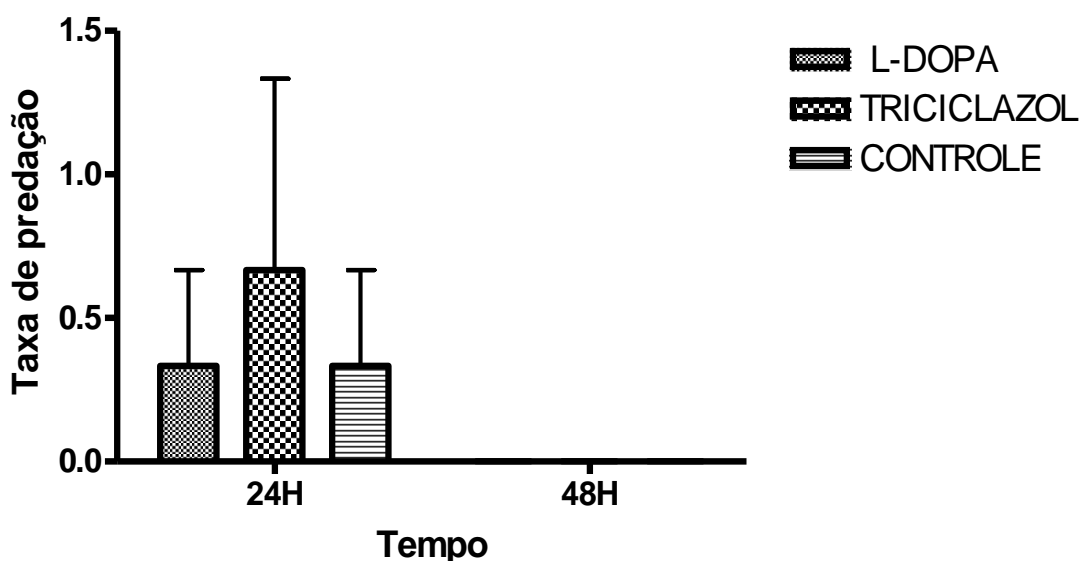
## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação da atividade predatória na interação fungo-nematoide.**

Com relação ao aspecto predatório e a produção de melanina em *A. oligospora*, não houve diferença significativa em relação a predação obtida após 24 e 48 h de observação ( $P > 0.05$ ), nas placas contendo L-DOPA, triciclazol e as placas controle (Fig. 9).

Cerca de 97% dos nematoides *Panagrellus* spp. foram capturados e predados nas primeiras 24 h de interação. O pequeno número de larvas encontradas vivas estava aprisionado nas hifas especializadas de redes adesivas com formação de

anéis em formato de loop, característicos da espécie *A. oligospora*. Nenhuma larva foi encontrada viva nas análises realizadas após 48h.



**Figura 9 - Captura e infecção: média da taxa de predação durante a interação fungo-nematoide nas situações:** *in vitro* (fungo cultivado em SDA com adição de L-DOPA, SDA com adição de triciclazol e o controle cultivado apenas em SDA) quantificadas e avaliadas nos tempos de 24 e 48 horas de interação. ( $P > 0.05$ ).

## 5.2 Avaliação do estresse por radiação ultravioleta

De acordo com análise do crescimento micelial obtido por meio da mensuração do diâmetro da colônia no período de 4 dias (Fig. 10), não se constatou diferenças significativas entre os tratamentos (1mM L-DOPA, 16 µl de triciclazol e controle) nos períodos de 5, 15, 30 e 45 minutos de exposição à radiação ultravioleta. Entretanto para as amostras analisadas após o período de 8 dias de incubação (Fig. 11), obteve-se um valor significativo ( $P < 0.05$ ) nas amostras de L-Dopa com exposição de 15 minutos com relação as amostras de triciclazol e controle em 15 minutos e também as amostras (L-Dopa com exposição de 30 minutos vs triciclazol 30 minutos) ( $P = 0.0003$ ) pela qual a colônia com adição de triciclazol desenvolveu-se melhor em relação à colônia tratada com L-DOPA. Apesar disso, com o aumento do tempo de exposição em 45 minutos, as amostras (triciclazol expostas à 45 minutos vs controle à 45 minutos) obtiveram um valor significativo ( $P = 0.0003$ ), visto que àquelas tratadas apenas com triciclazol, foram mais afetadas, no período de maior tempo de exposição, do que as colônias tratadas com 1mM de L-DOPA e as colônias em SDA.

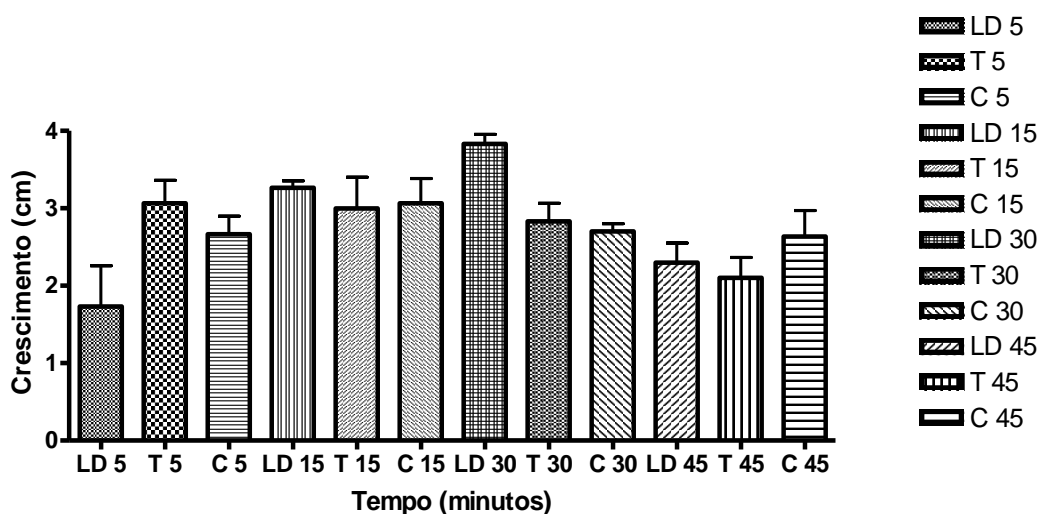


Figura 10 - Efeito da radiação ultravioleta sobre o crescimento micelial de *Arthrobotrys oligospora* após 4 dias. (LD – cultivos com a adição de L-DOPA, T – cultivos com a adição de triciclazol, C – cultivos em SDA). Referente ao tempo de exposição da radiação ultravioleta: 5, 15, 30 e 45 minutos. A sobrevivência relativa foi estimada em relação aos controles não expostos à radiação. Cada valor representa a média de crescimento e a barra indica o desvio-padrão da média.

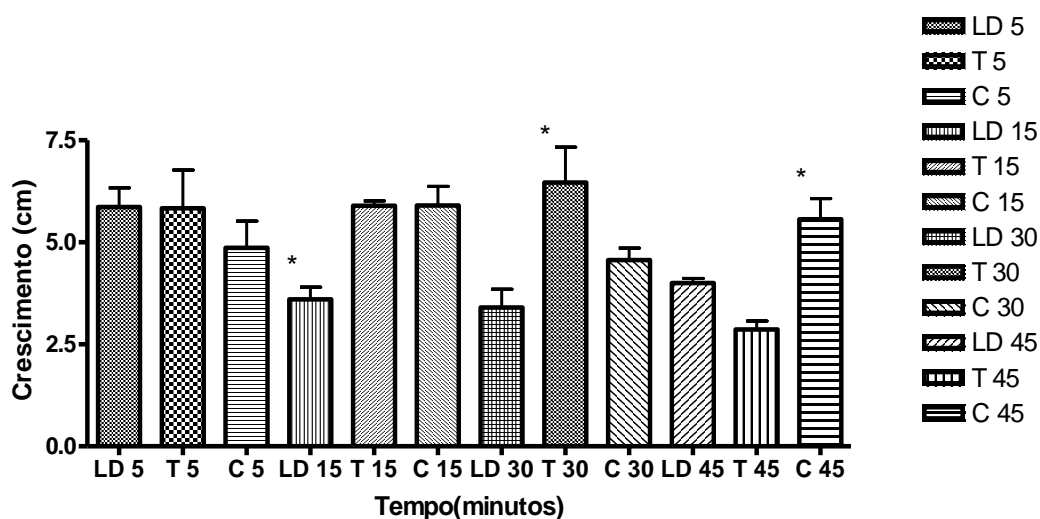
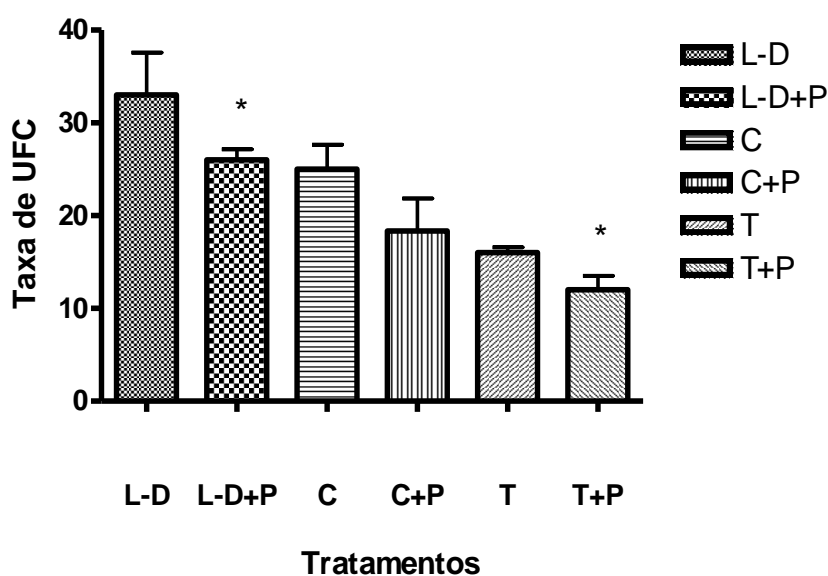


Figura 11 - Efeito da radiação ultravioleta sobre o crescimento micelial de *Arthrobotrys oligospora* após 8 dias. (LD – cultivos com a adição de L-DOPA, T – cultivos com a adição de triciclazol, C – cultivos em SDA). Referente ao tempo de exposição da radiação ultravioleta: 5, 15, 30 e 45 minutos. O crescimento relativo foi estimado em relação aos controles não expostos à radiação. Cada valor representa a média de crescimento e a barra indica o desvio-padrão da média. \*Indica a significância da comparação das médias entre as células melanizadas e não melanizadas dentro de cada tempo.

### 5.3 Análise do estresse oxidativo

Em relação à proteção conferida pela melanina aos danos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), constatou-se que as amostras tratadas com L-DOPA, apresentaram diferença significativa, em relação à amostra tratada com triciclazol (Fig. 12). Amostras tratadas com (L-Dopa + Peróxido de Hidrogênio vs amostras com Triciclazol + Peróxido de Hidrogênio ( $P < 0.05$ ), Controle + Peróxido de Hidrogênio vs Triciclazol + Peróxido de Hidrogênio ( $P > 0.05$ ), L-Dopa + Peróxido de Hidrogênio vs Controle + Peróxido de Hidrogênio ( $P > 0.05$ )). ( $P = 0.0016$ ) ( $F = 7.96$ )

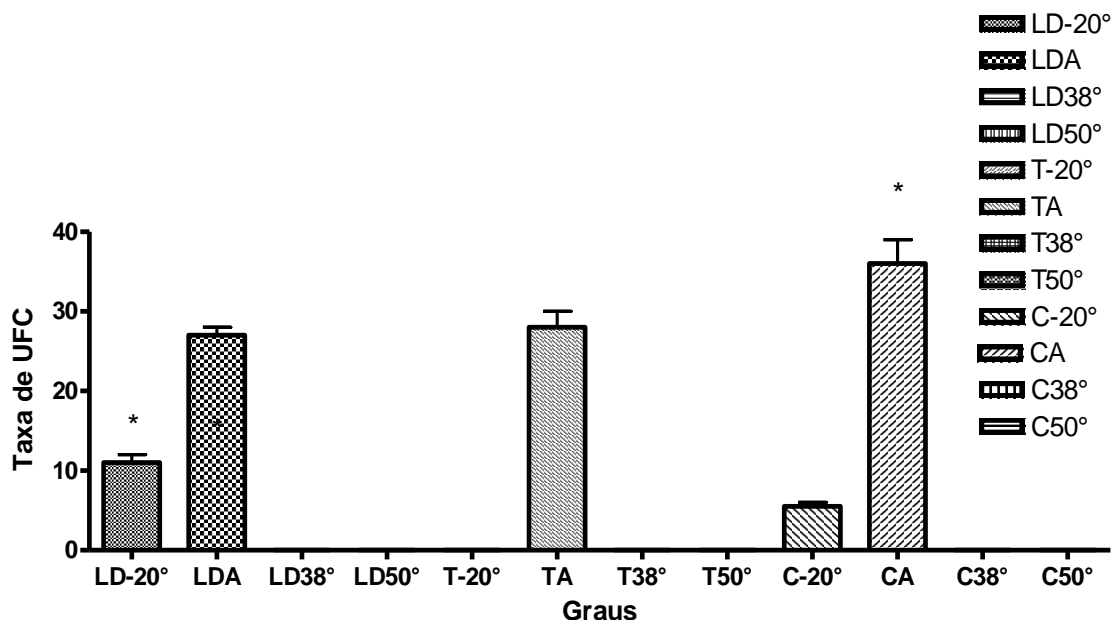


**Figura 12 - Efeito do estresse oxidativo sobre a UFC de *Arthrobotrys oligospora*.** Os dados apresentaram diferença significativa entre (L-D+P) l-dopa com esporos tratados com peróxido de hidrogênio e (T+P) triciclazol com adição dos esporos tratados com peróxido de hidrogênio ( $P < 0.05$ ). (L-D – L-DOPA; C – controle; T – triciclazol; P – peróxido de hidrogênio 50mM) \*Indica a significância da comparação das taxas de UFC submetidas e não submetidas a peróxido de hidrogênio.

### 5.4 Análise do estresse após exposição ao calor e ao frio.

As análises realizadas em 24 e 48 h, em temperaturas acima de 38°C resultaram na morte da maioria dos espécimes expostos, porém, sob o efeito da temperatura abaixo de zero grau (-20°C) no período de 24h, os tratamentos controle e L-DOPA apresentaram crescimento significativo de UFC ( $P = 0.001$ ), enquanto os esporos tratados com triciclazol não apresentaram crescimento no mesmo período analisado (Fig. 13).

E o crescimento de LD e T em temperatura ambiente também apresentou valores estatisticamente significativos com relação ao controle em temperatura ambiente ( $P= 0.01$ ). Sendo ( $P<0.05$ )



**Figura 13 - Efeito da temperatura sobre a UFC de *Arthrobotrys oligospora*.** (L-D – L-DOPA; C – controle; T – triclicazol; A – temperatura ambiente) -20°C, temperatura ambiente, 38°C, 50°C graus). \*Indica a significância da comparação do crescimento das UFC submetidas a diferentes temperaturas.

### 5.5 Análise da atividade predatória após incubação *in vitro*

Com relação aos resultados obtidos, afim de verificar a viabilidade dos esporos melanizados e não melanizados após serem submetidos ao estresse anaeróbico *in vitro*, com o inoculo ruminal, obtivemos uma alta variação na quantificação das L3 oriundas das coproculturas. Dessa forma, ao analisar o resultado da quantificação percebemos que não houve variação significativa entre as comparações dos tratamentos nos tempos de 0, 12, 24, 36 e 48h, em que foram submetidos e analisados sendo o valor de ( $P > 0.05$ ). Fig. 14 (Tempo em 0 horas), Fig. 15 (Tempo em 12 horas), Fig.16 (Tempo em 24 horas), Fig. 17 (Tempo em 36 horas), Fig. 18 (Tempo em 48 horas).

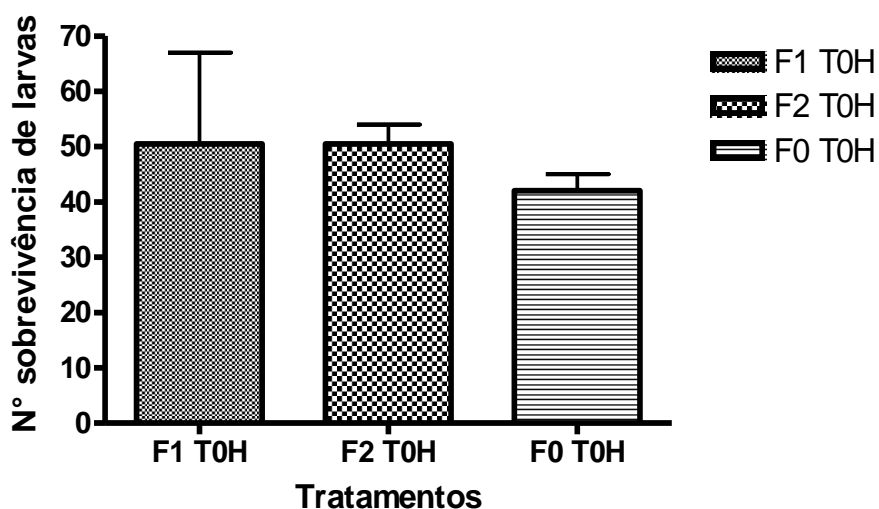


Figura 14 – Estresse anaeróbio *in vitro* com inoculo ruminal no tempo 0H. (F1 – esporos cultivados com 1mM de L-DOPA; F2 – esporos cultivados com 16ul de triciclazol, F0 – controle: esporos crescidos em SDA). ( $P > 0.05$ )

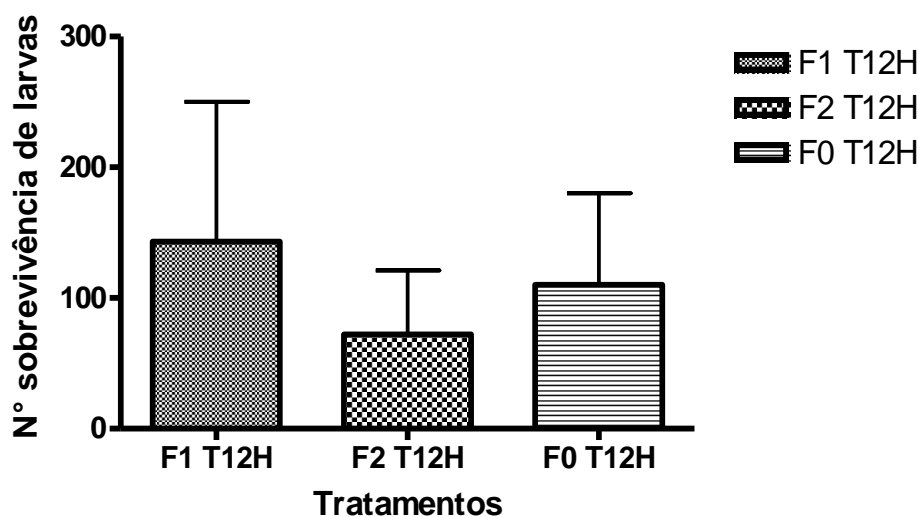


Figura 15 – Estresse anaeróbio *in vitro* com inóculo ruminal no tempo 12H. (F1 – esporos cultivados com 1mM de L-DOPA; F2 – esporos cultivados com 16ul de triciclazol, F0 – controle: esporos crescidos em SDA). ( $P > 0.05$ )



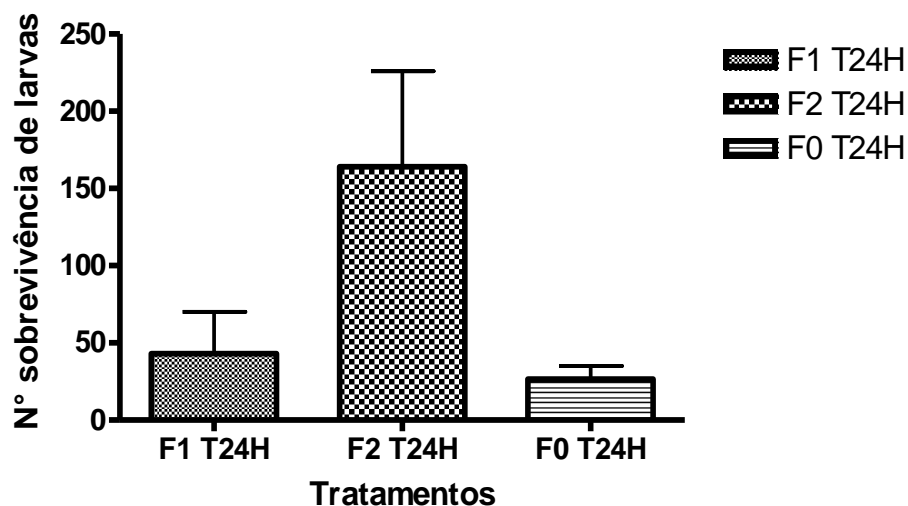


Figura 16 – Estresse anaeróbio *in vitro* com inóculo ruminal no tempo 24H. (F1 – esporos cultivados com 1mM de L-DOPA; F2 – esporos cultivados com 16ul de triciclazol, F0 – controle: esporos crescidos em SDA) ( $P > 0.05$ ).

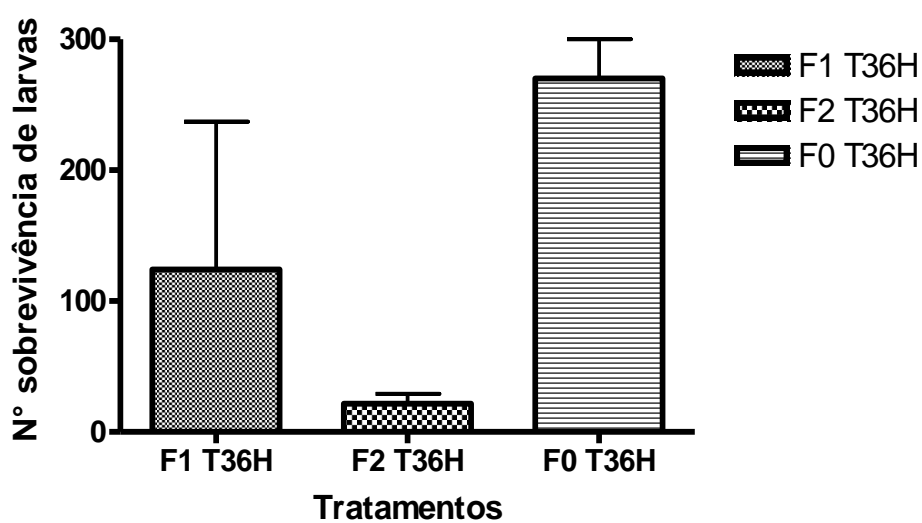
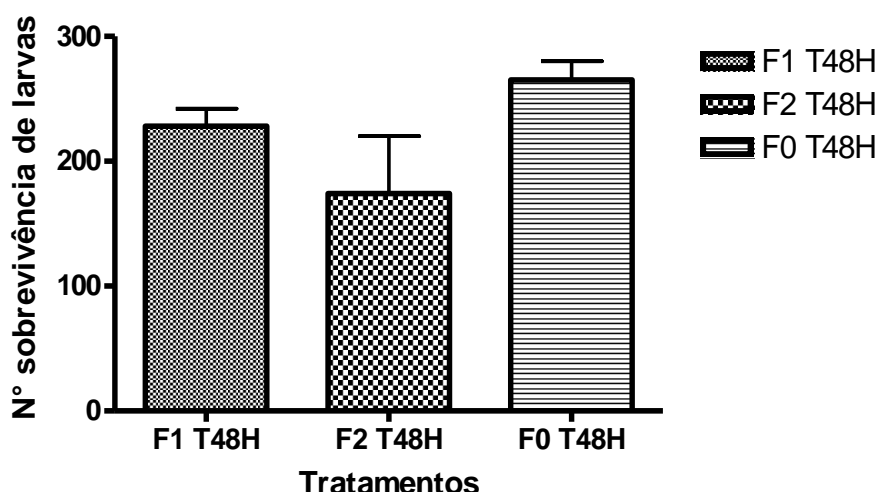


Figura 17 – Estresse anaeróbio *in vitro* com inóculo ruminal no tempo 36H. (F1 – esporos cultivados com 1mM de L-DOPA; F2 – esporos cultivados com 16ul de triciclazol, F0 – controle: esporos crescidos em SDA). ( $P > 0.05$ )



**Figura 18 – Estresse anaeróbio *in vitro* com inóculo ruminal no tempo 48H.** (F1 – esporos cultivados com 1mM de L-DOPA; F2 – esporos cultivados com 16ul de triciclazol, F0 – controle: esporos crescidos em SDA) ( $P > 0.05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A melanina é um pigmento ancestral que tem sido considerada um fundamental e importante elemento relacionado a resistência e proteção, presentes em todos os reinos e atuando nos mais diversos seres vivos, e nos fungos, tem sido associada à resistência das espécies fúngicas que se apresentam intensamente melanizadas (ZALAR *et al.*, 2011), podendo ser este o resultado de uma melhor adaptação desses e outros organismos as condições ambientais em que vivem (CRUZ *et al.*, 2018).

Aqui ao analisarmos o papel biológico da melanina no fungo nematófago *A. oligospora* melanizado e não melanizado observamos que este pigmento pode estar associado ao fator de proteção para radiação UV, estresses oxidativos e temperaturas extremas.

De acordo com os resultados obtidos na relação fungo-nematoide, a produção ou a inibição da melanina, não parece influenciar na atividade predatória do fungo *A. oligospora*, visto que em todos os tratamentos, com a adição de 1mM de L-DOPA, ou com a ausência da melanina, nos cultivos com a adição de 16  $\mu$ l de triciclazol e o controle, não obtiveram diferença significativa na taxa de predação do nematoide *Panagrellus* spp. Resultado semelhante foi encontrado no estudo realizado por Freitas *et al.*, (2019), com o fungo *D. flagrans*, onde a melanina também não influenciou na atividade predatória dessa outra espécie de fungo nematófago.

Aparentemente para espécies e isolados distintos de fungos nematófagos a atividade predatória independe da produção de melanina.

Contudo, análises adicionais com mais isolados e espécies poderiam ser feitos a fim de consolidar ou refutar esta conclusão.

Na resistência a exposição da radiação ultravioleta, com 4 dias não foi possível observar uma diferença entre os crescimentos que fosse significativa. De modo correspondente, em estudo realizado por Schiave (2007), não foram observadas diferenças significativas entre a tolerância de células melanizadas e não melanizadas ( $P=0,5472$ ) nas cepas de *Cryptococcus neoformans* e *C. laurentii* quando submetidas em 2 a 8 dias de exposição à radiação UV-B.

Porém com 8 dias de crescimento podemos notar em *A. oligospora* que na exposição de 30 minutos, o fungo com triciclazol, pareceu investir recursos no seu crescimento, sendo assim, é possível supor que poderia ter sido uma forma de investir na sua sobrevivência visto que a exposição à radiação ultravioleta poderia estar prejudicando de alguma forma.

Já na exposição de 45 minutos, em 8 dias de crescimento, notavelmente o fungo não melanizado estava com o seu crescimento prejudicado, e os fungos com adição de 1 mM de L-DOPA e o controle (SDA), apresentaram maior crescimento, sugerindo que quanto maior o tempo de exposição, mais as células não melanizadas seriam afetadas. Sendo necessários mais testes com maiores tempos de exposição para confirmação desta hipótese.

Em relação ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio, observamos que os cultivos tratados com L-DOPA e peróxido de hidrogênio, apresentaram uma taxa de crescimento das UFC, maior do que os cultivos tratados com o inibidor triciclazol e peróxido de hidrogênio, sendo notável o fato de que a melanina está associada a proteção aos radicais livres, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como também já havia sido afirmado nos estudos de Heidrich *et al.*, (2016) e Romero-Martinez *et al.*, (2000).

Na exposição do fungo a temperaturas extremas, nos períodos entre 24 e 48h horas, onde foram analisados os crescimentos das UFC, destacamos que na temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , houve o crescimento das UFC das colônias melanizadas com adição de 1 mM de L-DOPA e das colônias controle com SDA, já nas colônias tratadas com 16  $\mu\text{l}$  de triciclazol não houve crescimento. Nas temperaturas de  $50^{\circ}\text{C}$  e  $38^{\circ}\text{C}$  nenhum dos tratamentos apresentou crescimento de UFC, demonstrando

que diante desses graus de temperatura, a espécie *Arthrobotrys oligospora*, não apresenta resistência, mesmo os cultivos melanizados, não foram capazes de sobreviver as temperatura mais quentes durante o período de exposição, entretanto podemos notar que a melanina pode estar relacionada com o fator de proteção ao frio, visto que o fungo com a ausência de melanina não sobreviveu ao frio, resultado similar foi encontrado no estudo realizado por Rosas e Casadevall (1997).

A resistência a passagem pelo trato gastrintestinal é um fator determinante em fungos estudados para serem utilizados no controle biológico, para que a sua aplicação via oral possa ser utilizada com segurança.

E ao observarmos os resultados obtidos em análise da melanina como potencial fator de proteção ao estresse anaeróbio *in vitro* com inoculo ruminal, esta cepa de *A. oligospora* não conseguiu sobreviver aos estresses causados pelo inoculo ruminal, porém, em estudos anteriores uma cepa de um isolado russo de *A. oligospora* foi capaz de crescer e após a passagem pelo trato gastrintestinal e de realizar sua atividade predatória nas larvas de nematoides (SOPRUNOV, 1958).

Enquanto que um isolado sueco do fungo *A. oligospora* (ATCC24927), também não foi capaz resistir à passagem pelo trato gastrintestinal de ruminantes (GRØNVOLD *et al.* 1993).

Isso sugere que a sobrevivência após passagem pelo trato gastrintestinal vai depender das cepas pois sabemos que o isolamento geográfico pode influenciar nas variações das características biológicas e genéticas dos isolados, sendo necessário encontrar o melhor isolado em potencial para utilização como biocontrolador.

Desse modo, podemos destacar que em estudo realizado por Freitas *et al.*, (2019), na espécie *D. flagrans* a melanina apresentou papel fundamental para a proteção deste fungo na passagem dos esporos pelo trato gastrointestinal dos animais, conferindo ao fungo resistência aos estresses químicos encontrados no líquido ruminal, permitindo que os esporos permaneçam viáveis após serem submetidos ao estresse.

Entretanto, destacamos que o fungo *D. flagrans* apresenta abundante produção de clamidósporos, diferentemente do fungo *A. oligospora*, que não manifesta a produção de clamidósporos com facilidade. Portanto, acreditamos que não só a melanina pode estar associada a proteção e aumento da resistência aos estresses, mas que em diferentes espécies de fungos, ou até mesmo em diferentes cepas, a questão do caráter morfológico e estrutural dos esporos e clamidósporos,

também deve ser levada em consideração, quando destacamos resistência ao compararmos duas espécies distintas de fungos, ou diferentes cepas de fungos nematófagos.

Durante a execução dos experimentos, percebemos que os cultivos tratados com triciclazol apresentaram redução da produção dos esporos em relação aos tratamentos com adição do precursor de melanina (L-DOPA) e o controle (onde não havia adição de nenhum tratamento), sendo assim, a redução da produção de melanina pode desencadear um prejuízo para a esporulação fúngica, porém, ainda não sabemos em quais vias bioquímicas da produção de esporos a melanina estaria relacionada, e em qual etapa o efeito do triciclazol afetaria a esporulação, e com quais moléculas a mais estaria relacionada.

E através destes resultados destacamos o potencial da melanina em conferir proteção a fatores que desencadeiam estresses ambientais para isolados fúngicos.

## **7 CONCLUSÃO**

No fungo nematófago *A. oligospora*, podemos confirmar o papel da melanina relacionado ao fator de proteção contra radiação ultravioleta, onde sugere-se que quanto maior o nível de exposição, mais afetadas serão as células com ausência de melanina. Quanto aos estresses oxidativos (ROS), os cultivos melanizados apresentaram maior crescimento em relação aos não melanizados. Os cultivos melanizados e controle sobreviveram a temperaturas baixas, enquanto os cultivos com o inibidor da melanina não foram capazes de sobreviver. E os resultados obtidos com relação a influência da melanina na predação e captura de nematoides, demonstraram que não há relação entre a melanização e o aumento ou redução da capacidade de predação. Somente a presença da melanina não foi suficiente para que houvesse uma alta taxa de predação das L3 após a passagem pelo trato gastrointestinal, o que sugere também que a sobrevivência do fungo pode ter sido afetada, deste modo, além da melanização, a resistência aos estresses também pode depender de outros fatores que podem ser estruturais, morfológicos e químicos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLAFIA, J; ALIZADEH, M; KHAKVAR, R. Description of *Panagrellus ulmi* sp. n. (Rhabditida, Panagrolaimidae) from Iran, and comments on the species of the genus and its relatives. *Zootaxa*, v. 4162, n. 2, p. 245-267, 2016.

ALLAM, N.G.; EL-ZAHER, E.H.F. Protective role of *Aspergillus fumigatus* melanin against ultraviolet (UV) irradiation and *Bjerkandera adusta* melanin as a candidate vaccine against systemic candidiasis. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 24, p. 6566-6577, 2012.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 5, p. 554-562, 2009.

ARAÚJO, J. V. *et al.* Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 13, n. 2, p. 65-71, 2004.

ARAÚJO-FILHO, J.V. *et al.* Abordagens fenotípica e genotípica para detecção de resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de ovinos no nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 30, 2021.

BARBER, J.I.; TOWNSEND, D.; OLDS, D.P.; KING, R.A. Decreased dopachrome oxidoreductase activity in yellow mice. *Journal of Heredity*, v. 76, n. 1, p. 59-60, 1985.

BARRON, G. L. Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, v. 9, p. 311-326, 1992.

BARRON, G. L. *The nematode-destroying fungi*. Canadian Biological Publishers, Guelph, Ontario, Canada. 140 pp, 1977.

BERTHELOT, C. *et al.* Unravelling the role of melanin in Cd and Zn tolerance and accumulation of three dark septate endophytic species. *Microorganisms*, v. 8, n. 4, p. 537, 2020.

BIRD, J.; HERD, R. P. *In vitro* assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Veterinary Parasitology*, v. 56, n. 1-3, p. 181-187, 1995.

BONADIMAN, S.F.; EDERLI, N.B.; SOARES, A.K.P.; MORAES NETO, A.H.A.; SANTOS, C.P.; DaMATTA, R.A. Occurrence of *Libyostrongylus sp.*(nematoda) in ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) from the north region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.137, p.175-179. 2006.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; ARAUJO, J.M. CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 6, p. 686-688, 2008.

BRAGA, F.R.; FERRAZ, C. M.; DA SILVA, E. N., DE ARAÚJO, J. V. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control in vivo and in vitro of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *3 Biotech*, v. 10, n. 2, p. 1-5, 2020.

BRUNSKOLE ŠVEGELJ, Mojca *et al.* Novel inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase with antifungal activity identified by ligand-based and structure-based virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, v. 51, n. 7, p. 1716-1724, 2011.

BUSH, W.D. ; GARGUILO, J; ZUCCA, F.A; ALBERTINI, A.; ZECCA, L.; EDWARDS, G.S.; NEMANICH, R.J.; SIMON,J.D. The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.103, p.14785–9, 2006.

BUZATTI, A.; SANTOS, C.P.; FERNANDES, M.A.M.; YOSHITANI, U.Y.; SPRENGER, L.K.; DOS SANTOS, C.D.; MOLENTO, M.B. *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Experimental Parasitology*, v. 159, p. 1-4, 2015.

CAO, Wei *et al.* Unraveling the structure and function of melanin through synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, v. 143, n. 7, p. 2622-2637, 2021.

CARDOSO, E.R.; ASSIS, L.C; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. *Summa Phytopathologica*, v. 35, n. 4, p. 267-272, 2009.

CASADEVALL, A.; NAKOUZI, A.; CRIPPA, P.R.; EISNER, M. Fungal melanins differ in planar stacking distances. *PlosOne*, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2012.

CHANG, T. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 6, p. 2440-2475, 2009.

CHANDRAWATHANI, P.; OMAR, J.; WALLER, P. J. The control of the free-living stages of *Strongyloides papillosus* by the nematophagous fungus, *Arthrobotrys oligospora*. *Veterinary Parasitology*, v. 76, n. 4, p. 321-325, 1998.

CINCOTTA, A. *et al.* Pterosaur melanosomes support signalling functions for early feathers. *Nature*, v. 604, n. 7907, p. 684-688, 2022.

COOKE, R. C.; GODFREY, B. E. S. A key to the nematode-destroying fungi. *Transactions of the British mycological society*, v. 47, n. 1, p. 61-74, 1964.

COOKE, RODERIC C. Ecological characteristics of nematode-trapping Hyphomycetes: I. Preliminary studies. *Annals of applied biology*, v. 52, n. 3, p. 431-437, 1963.



CORDERO, R. JB; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, v. 31, n. 2, p. 99-112, 2017.

CORDERO, R. JB; VIJ, R.; CASADEVALL, A. Microbial melanins for radioprotection and bioremediation. *Microbial Biotechnology*, v. 10, n. 5, p. 1186, 2017.

CRUZ, I.L.R *et al.* Avaliação da produção de melanina por *Sporothrix luriei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, p. 68-70, 2018.

DADACHOVA, E.; BRYAN, R. A.; HOWELL, R. C.; SCHWEITZER, A.D.; AISEN, P.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 21, n. 2, p. 192-199, 2008.

DE ANGELIS, F. *et al.* Partial structures of truffle melanins. *Phytochemistry*, v. 43, n. 5, p. 1103-1106, 1996.

DOUBLE, K. L. *et al.* The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 11, p. 1669-1682, 2008.

DRESCHLER, C. Some Hyphomycetes That Prey on Free-Living Terricolous Nematodes. *Mycologia*. p. 447–552, 1937

D'ISCHIA, M.; WAKAMATSU, K.; NAPOLITANO, A.; BRIGANTI, S.; GARCIA-BORRON, J.C.; KOVACS, D.; MEREDITH, P.; PEZZELLA, A.; PICARDO, M.; SARNA, T.; SIMON, J.D.; ITO, S. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 26, n. 5, p. 616-633, 2013.

DUDDINGTON, C.L. Nematode-destroying fungi in agricultural soils. *Nature* .13;173 (4402):500-1. Mar 1954.

DUDDINGTON, C. L.; WYBORN, C. H. E. Recent research on the nematophagous hyphomycetes. *The Botanical Review*, v. 38, n. 4, p. 545-565, 1972.

EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 931-940, 2012.

FERRARI, E. *et al.* Synthesis, structure characterization, and evaluation in microglia cultures of neuromelanin analogues suitable for modeling Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 8, n. 3, p. 501-512, 2017.

FERRIS, H. *et al.* The beer mat nematode, *Panagrellus redivivus*: A study of the connectedness of scientific discovery. *J Nematode Morphol Syst*, v. 12, n. 1, p. 19-25, 2009.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G.; DOS SANTOS, F.B.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA-PAES, R. I-Dihydroxyphenylalanine induces melanin production by members of the genus *Trichosporon*. *FEMS Yeast Research*, v. 14, n. 6, p. 988-991, 2014.

FRANZEN, A.J.; CUNHA, M.M.L.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; SILVA, M.B.; SALGADO, C.G.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Journal of Structural Biology*, v. 162, n. 1, p. 75-84, 2008.

FEDOROW, H. *et al.* Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, v. 75, n. 2, p. 109-124, 2005.

FONTENOT, ME.; MILLER, JE.; PEÑA, MT.; LARSEN, M., & GILLESPIE, A. Eficiência da alimentação de chlamydosporos de *Duddingtonia flagrans* para ovelhas em pastejo na redução da disponibilidade de larvas de nematóides parasitas em pastagens. *Veterinary Parasitology*, v. 118, n. 3-4, pág. 203-213, 2003.

FREITAS, D. Caracterização e produção de melanina pelo fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* e avaliação da sua participação na atividade predatória. 2017.

FREITAS, F. D.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; MATHIAS, L.S, ASSIS FRANCO, R.W, GOMES, R.S, MENDONÇA VIEIRA, R.A, ROCHA, L.O, OLIVARES, F.L & SANTOS, C.P. Synthesis and role of melanin for tolerating in vitro rumen digestion in *Duddingtonia flagrans*, a nematode-trapping fungus, *Mycology*, 10:4, 229-242, 2019.

FRESENIUS, GEORG. Beiträge zur mykologie. 1850.

FRIEDMANN, E. I; MCKAY, C. P.; NIENOW, J. A. The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: satellite-transmitted continuous nanoclimate data, 1984 to 1986. *Polar Biology*, v. 7, n. 5, p. 273-287, 1987.

GARCEZ, C.S.N. Resistência anti-helmíntica em nematódeos de ovinos na microrregião de Catu no estado da Bahia. 2021.

GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Sabouraudia*, v. 39, n. 4, p. 353-357, 2001.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. Jt. Forage fiber analysis. Agricultural handbook no. 379. US Department of Agriculture, Washington, DC, p. 1-20, 1970.

GOMES, A. P. S. *et al.* In vitro interaction of Brazilian strains of the nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* spp. on *Panagrellus* sp. and *Cooperia punctata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 861-864, 2001.

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, n. 1, p. 91-97, 2008.

GORDON, H. McL *et al.* A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res*, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GRØNVOLD, J., WOLSTRUP, J., NANSEN, P., *et al*/ Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. *Vet Parasitol*, v. 48, p. 311-325, 1993.

HAARD, Karen. Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys* Corda. *Mycologia*, v. 60, n. 6, p. 1140-1159, 1968.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J.C.; HAMDY, M.; LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 2, p. 219-232, 2006.

HALL, M. B; MERTENS, D. R. *In vitro* fermentation vessel type and method alter fiber digestibility estimates. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 1, p. 301-307, 2008.

HASHMI, H. A.; CONNAN, R. M. Biological control of ruminant trichostrongylids by *Arthrobotrys oligospora*, a predacious fungus. *Parasitology Today*, v. 5, n. 1, p. 28-30, 1989.

HEALEY K, LAWLOR C, KNOX MR, CHAMBERS M, LAMB J. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Vet Parasitol*. 2018 Apr 15;253:48-54. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.010. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29605003.

HEIDRICH, D., FERNANDES, E. K., MENDES, S. D. C., ALVES, K. D. O., BONAPAZ, L. D. S., RIBEIRO, A. C., ... & SCROFERNEKER, M. L. Proteção da melanina ao estresse oxidativo em *fonsecaea* spp. *Anais*. 2016.

HECHLER, H. C. Reproduction, chromosome number, and postembryonic development of *Panagrellus redivivus* (Nematoda: Cephalobidae). *Journal of Nematology*, v. 2, n. 4, p. 355, 1970.

HERRERA-ESTRELLA, A.; CASAS-FLORES, S.; KUBICEK, P.C. Nematophagous Fungi. In: DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P. (Eds.) *Environmental and Microbial*

Relationships, 3<sup>rd</sup> Ed, The Mycota IV. Springer International Publishing, Switzerland, p. 247-247, 2016.

IKEMOTO, K. *et al.* Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neuroscience letters*, v. 253, n. 3, p. 198-200, 1998.

IVANOVA, E; PERFILIEVA, K; SPIRIDONOV, S. *Panagrellus levitatus* sp. n. (Rhabditida: Panagrolaimidae), a nematode suppressing *Drosophila melanogaster* in laboratory cultures. *Nematology*, v. 20, n. 3, p. 285-297, 2018.

JACOBSON, ERIC S.; TINNELL, Sheri B. Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of bacteriology*, v. 175, n. 21, p. 7102-7104, 1993.

JANSSON H-B, LOPEZ-LLORCA LV. Control of nematodes by fungi. In: Arora, D.K. (Ed.). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. New York: Marcel Dekker, 2004.

JAFFEE, B. A. Do organic amendments enhance the nematode-trapping fungi *Dactylellina haptotyla* and *Arthrobotrys oligospora*? *Journal of Nematology*, v. 36, n. 3, p. 267, 2004.

KEJZAR, A.; GOBEC, S.; PLEMENITAS, A.; LENASSI, M. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biology*, v. 117, n. 5, p. 368-379, 2013.

KOBAYASHI, T.; VIEIRA, W.D.; POTTERF, B.; SAKAI, C.; IMOKAWA, G.; HEARING, V.J. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 108, n. 6, p. 2301-2309, 1995.

KOEHLER, A. Suscetibilidade e adaptações metabólicas do agente da cromoblastomicose *Fonsecaea pedrosoi* frente ao itraconazol e ao triciclazol utilizando FTIR e quimiometria. 2019.

LANGFELDER, K. *et al.* Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal genetics and biology*, v. 38, n. 2, p. 143-158, 2003.

LAVENS, P. *et al.* Manual on the production and use of live food for aquaculture. Food and Agriculture Organization (FAO)., 1996.

LEE, D. *et al.* Unraveling melanin biosynthesis and signaling networks in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, v. 10, n. 5, p. e02267-19, 2019.

LI, J., ZOU, C., XU, J., JI, X., NIU, X., YANG, J., HUANG, X., ZHANG, K.Q., Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions, basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology*. 53, 67 -95, 2015.

LI, S. *et al.* Aplicação Individual e Combinada de Fungos Nematófagos como Agentes de Controle Biológico de Nematódeos Gastrointestinais em Animais Domésticos. *Patógenos* , v. 11, n. 2, pág. 172, 2022.

LIU, X.; ZHANG, K.Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. *Mycological Research*, v. 98, n. 8, p. 862-868, 1994.

MAGARELLI, M.; PASSAMONTI, P.; RENIERI, C. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia Officinalis*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, v. 5, n. 2, p. 18-29, 2010.

MASON, H. S. The chemistry of melanin; mechanism of the oxidation of catechol by tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*. v. 181, p. 803-812, 1949.

MARS, U.; LARSSON, B. S. Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. *Pigment Cell Res*. 12:266–274; 1999.

MATTOON, E.; CORDERO, R.; CASADEVALL, A. Fungal melanins and applications in healthcare, bioremediation and industry. *J. Fungi*, 7, 488, 2021.

MAURER, V. *et al.* A suplementação de urze (*Calluna vulgaris*) não reduz a capacidade de captura de *Duddingtonia flagrans* em fezes de cordeiros infectados com *Haemonchus contortus*. *Parasitologia Veterinária*, p. 109661, 2022.

MCNAMARA, M.E. *et al.* Decoding the evolution of melanin in vertebrates. *Trends in ecology & evolution*, v. 36, n. 5, p. 430-443, 2021.

MEERUPATI, T.; ANDERSSON, K. M.; FRIMAN, E.; KUMAR, D.; TUNLID, A.; AHRÉN, D. Genomic mechanisms accounting for the adaptation to parasitism in nematode-trapping fungi. *PLoS Genet*, v. 9, n. 11, p. 1-20, 2013.

MO M-H, CHENW-M, HAO-RANYANG, ZHANG K-Q. Diversity and metal tolerance of nematode-trapping fungi in Pbpolluted soils. *J Microbiol.* 46:16–22, 2008

MOLINA, Isabella; ROJAS, Elizabeth; RODRIGUEZ, Diego. Melanina microbiana como produto biotecnológico, sus aplicaciones en salud y desarrollo en Colombia. 2021.

NADLER, S. A. *et al.* Phylogeny of Cephalobina (Nematoda): molecular evidence for recurrent evolution of probolae and incongruence with traditional classifications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 40, n. 3, p. 696-711, 2006.

NORDBRING-HERTZ, B., JANSSON, H., TUNLID, A. Nematophagous Fungi. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2006.

NORDBRING-HERTZ, B. Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*-an extensive plasticity of infection structures. *Mycologist*, v. 18, n. 3, p. 125-133, 2004.

PACELLI, C.; BRYAN, R.A.; ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; SHURYAK, I.; DADACHOVA, E. Melanin is effective in protecting fast and slow growing fungi from various types of ionizing radiation. *Environ. Microbiol.* 19, 1612–1624, 2017.

PAULIN, João V. *et al.* Melanina, um pigmento natural multifuncional. arXiv preprint arXiv:2107.12481, 2021.

PENA, M. T.; MILLER, J. E.; FONTENOT, M. E.; GILLESPIE, A., & LARSEN, M. Avaliação de *Duddingtonia flagrans* na redução de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* em fezes de ovinos. *Veterinary Parasitology*, v. 103, n. 3, pág. 259-265, 2002.

PEREZ-DULZAIDES, R. *et al.* Cell-wall dyes interfere with *Cryptococcus neoformans* melanin deposition. *Microbiology*, v. 164, n. 8, p. 1012, 2018.

PINHEIRO, F. L. *et al.* Caracterização química da melanina de pterossauro desafia inferências de cor em animais extintos. *Relatórios científicos*, v. 9, n. 1, pág. 1-8, 2019.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, v. 53, n. 3, p. 429-443, 2006.

PRADO, Gustavo Marcondes Evangelista Martins. **Pigmentação fóssil**: tafonomia física de penas fósseis das bacias do Araripe (Cretáceo) e Taubaté (Paleógeno), Brasil. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Acesso em: 02 jul. 2022

PROTA, G. Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Research*, v. 13, n. 4, p. 283-293, 2000.

ROBERTSON, K.L.; MOSTAGHIM, A.; CUOMO, C.; SOTO, C.M.; LEBEDEV, N.; BAILEY, R.F.; WANG, Z. Adaptation of the Black Yeast *Wangiella dermatitidis* to ionizing radiation: Molecular and cellular mechanisms. *PLoS ONE*, 7, e48674, 2012.



ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

ROMERO-MARTINEZ, R., WHEELER, M., GUERRERO-PLATA, A., RICO, G., TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*, 68:3696-3703, 2000.

ROSAS, Á.L; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS microbiology letters*, v. 153, n. 2, p. 265-272, 1997.

SALEH, Y. G.; MAYO, M. S.; AHEARN, D. G. Resistance of some common fungi to gamma irradiation. *Applied and environmental microbiology*, v. 54, n. 8, p. 2134-2135, 1988.

SANTIAGO, C. B.; GONZAL, A. C.; RICCI, M.; HARPAZ, S. Response of bighead carp *Aristichthys nobilis* and Asian catfish *Clarias macrocephalus* larvae to free-living nematode *Panagrellus redivivus* as alternative feed. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 19, n. 4, p. 239-243, 2003.

SANTOS, C.P Fungos nematófagos. In: alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes, Coordenação Veríssimo, C. J.– Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 83 -103. 2008.

SAKEMI, S. *et al.* CJ-12, 371 and CJ-12, 372, Two Novel DNA Gyrase Inhibitors Fermentation, Isolation, Structural Elucidation and Biological Activities. *The Journal of Antibiotics*, v. 48, n. 2, p. 134-142, 1995.

SAXENA G. Observations on the occurrence of nematophagous fungi in Scotland. *Appl Soil Ecol.* 39:352–357, 2008.

SELBMANN, L. *et al.* Fungos à beira da vida: fungos negros criptoendolíticos do deserto antártico. *Stud Mycol*, v. 51, n. 1, pág. 1-32, 2005.

SILVA, I. M.; Síntese da melanina em *Arthrobotrys oligospora* (Fres.) Via espectroscopia de infravermelho, ressonância paramagnética eletrônica e ultraestrutura. Campos dos Goytacazes, 2019. 40 p. Monografia (Graduação Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 295p, 1997.

SIQUEIRA, R.S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa Agroindustrial de Alimentos, 95p, 1995.

SOLANO, F. Melanins: skin pigments and much more types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, v. 2014, p. 1-28, 2014.

SOLANO, F. Melanin and melanin-related polymers as materials with biomedical and biotechnological applications—cuttlefish ink and mussel foot proteins as inspired biomolecules. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 7, p. 1561, 2017.

SOPRUNOV, F.F. Predacious hyphomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes Ashkhabad, p 365, 1958. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations, pp 292, 1966 (traduzido do russo por NEMCHINOK, S).

SCHIAVE, L.A. Viabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e não melanizadas entre linhagens de '*Cryptococcus neoformans*' e entre linhagens de '*Cryptococcus laurentii*'. 2007. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. doi:10.11606/D.60.2007.tde-03042009-102935.

STALEY, J. T.; PALMER, F; ADAMS, J.B. Microcolonial fungi: common inhabitants on desert rocks?. *Science*, v. 215, n. 4536, p. 1093-1095, 1982.

STEFANELLO, L; DA SILVA LORETO, E.L. *Panagrellus redivivus*: um promissor nematoide para aulas práticas de Biologia celular. Research, Society and Development, v. 11, n. 2, p. e29311225629-e29311225629, 2022.

STERFLINGER, K. Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 501-514, 2006.

STERFLINGER, K; TESEI, D; ZAKHAROVA, K. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. Fungal ecology, v. 5, n. 4, p. 453-462, 2012.

STOCK, S. P; NADLER, S. Morphological and molecular characterisation of *Panagrellus* spp.(Cephalobina: Panagrolaimidae): taxonomic status and phylogenetic relationships. Nematology, v. 8, n. 6, p. 921-938, 2006.

STRYCKER, B. D. *et al.* Caracterização Raman das Vias de Biossíntese de Melanina Fúngicas DHN e DOPA. Revista dos Fungos, v. 7, n. 10, pág. 841, 2021.

SULZER, D *et al.* Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 22, p. 11869-11874, 2000.

TIAN, S.; GARCIA-RIVERA, J.; YAN, B.; CASADEVALL, A.; STARK, R.E. Unlocking the molecular structure of fungal melanin using <sup>13</sup>C biosynthetic labeling and solid-state NMR. Biochemistry, v. 42, n. 27, p. 8105-8109, 2003.

TOKOUSBALIDES, M. Chrysayi; SISLER, H. D. Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. Pesticide biochemistry and physiology, v. 11, n. 1-3, p. 64-73, 1979.

TORRES-CRUZ, T.J. *et al.* Presença e distribuição de fungos tolerantes a metais pesados em solos superficiais de uma floresta temperada de pinheiros. Applied Soil Ecology, v. 131, p. 66-74, 2018.

TRESEDER, K.K.; LENNON, J.T. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 2, p. 243-262, 2015.

TUNLID, A.; JANSSON, S. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 10, p. 2868-2872, 1991.

URÁN, M.E; CANO, L.E. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Infectio*, v. 12, n. 2, 2011.

VAN OORSCHOT C.A.N. Taxonomy of the Dactylaria complex. V. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *Studies in Mycology*, 26: 61-96. 1985.

WACHIRA P, MIBEY R, OKOTH S, KIMENJU J, KIARIE J. Diversity of nematode destroying fungi in Taita Taveta, Kenya. *Fungal Ecol.* 2:60–65, 2009.

WAKAMATSU, K. *et al.* The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods. *Journal of neurochemistry*, v. 86, n. 4, p. 1015-1023, 2003.

WHEELER, M., BELL, A.A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Current Topics in Medical Mycology*. 2, 338, 1988.

YABUUCHI, E; OHYAMA, A. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* productoras de “pyomelanina”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 22, n. 2, pág. 53-64, 1972.

YANG, Y.; YANG, E.; AN, Z.; XINGZHONG, L. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from r-RNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 20, p. 8379-8384, 2007.

YANG, J.; WANG, L.; JI, X.; FENG, Y.; LI, X.; ZOU, C.; XU, J.; REN, Y.; MI, Q.; WU, J.; *et al.* Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathog*, 7, e1002179, 2011.

YANG, J. *et al.* *In vitro* inferred interactions of selected entomopathogenic fungi from Taiwan and eggs of *Meloidogyne graminicola*. *Mycological Progress*, v. 19, n. 1, p. 97-109, 2020.

ZALAR, P.; NOVAK, M.; DE HOOG, G.S.; GUNDE-CIMERMAN, N. Dishwashers-a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*, v. 115, n. 10, p. 997-1007, 2011.

ZECCA, L. *et al.* Substantia nigra neuromelanina: estrutura, síntese e comportamento molecular. *Patologia Molecular*, v. 54, n. 6, pág. 414, 2001.

ZHANG, Y.; QIAO, M.; XU, J.; CAO, Y.; ZHANG, K.Q.; YU, Z.F. Genetic diversity and recombination in natural populations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* from China. *Ecology and Evolution*, v. 3, n. 2, p. 312-325, 2013.

ZHDANOVA, N.N.; ZAKHARCHENKO, V.A.; VEMBER, V.V.; NAKONECHNAYA, L.T. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research*, v. 104, n. 12, p. 1421-1426, 2000.

ZHU, M-C. *et al.* Mecanismo regulador da formação de armadilhas em fungos que capturam nematóides. *Revista dos Fungos*, v. 8, n. 4, pág. 406, 2022.