



EDITORES

Luiz Antonio de **Oliveira** Maria Aparecida de **Jesus** Ani Beatriz **Jackisch Matsuura** Luadir **Gasparotto**
Juliana Gomes de Souza **Oliveira** Reginaldo Gonçalves de **Lima-Neto** Liliane Coelho da **Rocha**

Conhecimento,
conservação e uso de
FUNGOS

PRESIDENTE DA REPÚBLICA

Jair Messias Bolsonaro

MINISTRO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Marcos César Pontes

DIRETORA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Antonia Maria Ramos Franco Pereira

EDITORES

Luiz Antonio de **Oliveira** Maria Aparecida de **Jesus** Ani Beatriz **Jackisch Matsuura** Luadir **Gasparotto**
Juliana Gomes de Souza **Oliveira** Reginaldo Gonçalves de **Lima-Neto** Liliane Coelho da **Rocha**

Conhecimento,
conservação e uso de
FUNGOS



Manaus
2019

Copyright © 2019, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta obra pode ser reproduzida, arquivada ou transmitida, em qualquer forma ou por qualquer meio, sem permissão escrita da organização do evento.

EDITORES

Oliveira, L.A., Jesus, M.A., Jackisch-Matsuura, A.B., Gasparotto, L., Oliveira, J.G.S, Lima-Neto, R.G., Rocha, L.C.

EDIÇÃO TÉCNICA

Luiz Antonio de Oliveira, Maria Aparecida de Jesus, Luadir Gasparotto, Ani Beatriz Jackisch Matsuura e Liliane Coelho da Rocha

REVISÃO TÉCNICA

Luiz Antonio de Oliveira, Luadir Gasparotto e Maria Aparecida de Jesus

FOTOGRAFIAS

As fotos dos fungos da capa dos anais foram as selecionadas no concurso de fotografia “Maria Eneyda Pacheco Kauffman Fidalgo”

EDITORA INPA

Editor: Mario Cohn-Haft.

Produção editorial: Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes.

Bolsistas: Alan Alves, Luiza Veloso, Mariana Franco, Mirian Fontoura, Neoliane Cardoso, Stefany de Castro.

CAPA

Rodrigo Verçosa

DIAGRAMAÇÃO

Juliana Gomes de Souza Oliveira e Rodrigo Verçosa

EDITORAÇÃO ELETRÔNICA

Rodrigo Verçosa

Todos os resumos publicados neste livro fornecidos pelos autores e o conteúdo dos textos é de exclusiva responsabilidade dos mesmos. A comissão editorial não se responsabiliza por consequências decorrentes do uso de quaisquer dados, afirmações e/ou opiniões inexatas ou que conduzam a erros publicados nos resumos. É de inteira responsabilidade dos autores o registro dos trabalhos nos conselhos de ética de uso de animal (CEUA, Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) e a Lei da biodiversidade brasileira Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

Catálogo na Publicação (CIP)

Ficha catalográfica elaborada por Inácio Oliveira – CRB-11/888

C749 Conhecimento, conservação e uso de fungos / Editores: Luiz Antonio de Oliveira, Maria Aparecida de Jesus, Ani Beatriz Jackisch Matsuura, Juliana Gomes de Souza Oliveira, Luadir Gasparotto, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Liliane Coelho da Rocha. - Manaus : Editora INPA, 2019.
17.837 kb, pdf.

Trabalhos oriundos do IX Congresso Brasileiro de Micologia.

ISBN : 978-85-211-0199-4

1. Micologia 2. Ecologia fúngica. 3. Biotecnologia.

CDD 579.5



Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936, Petrópolis
Cep : 69067-375 Manaus – AM, Brasil
Tel: 55 (92) 3643-3223
www.inpa.gov.br | e-mail: editora@inpa.gov.br

Apresentação

A publicação deste livro com o conteúdo das palestras que foram apresentadas durante o IX Congresso Brasileiro de Micologia, realizado no período de 24 a 27 de junho de 2019 na cidade de Manaus - Amazonas, tem a finalidade de reunir os conhecimentos científicos apresentados por pesquisadores brasileiros e estrangeiros nas mais diversas áreas da Micologia e disponibilizar com acesso irrestrito para a comunidade, como alunos de graduação e pós-graduação, pesquisadores nacionais e internacionais com interesse nas diferentes áreas de aplicação da micologia e profissionais de empresas, incubadoras e privadas ligadas à aplicação biotecnológica de fungos.

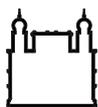
Esperamos que essa iniciativa tenha alcançado seus objetivos a contento e que as informações científicas contidas nessa obra possam contribuir para o avanço do conhecimento da micologia e para o desenvolvimento científico brasileiro.

Agradecemos a todos da Comissão Editorial e Científica e principalmente os Autores dos textos que se empenharam para a sua divulgação.

A Comissão Organizadora
IX Congresso Brasileiro de Micologia CBMy-2019

Agradecimentos

Realização



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEONIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia



Apoio



Empresa Estadual de
Turismo do Amazonas



Secretaria de
**Desenvolvimento
Econômico, Ciência,
Tecnologia e Inovação**



AMAZONAS
GOVERNO DO ESTADO

Agência



Organizadores da obra

Luiz Antonio de Oliveira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
luiz.oliveira@inpa.gov.br

Maria Aparecida de Jesus
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
ranna@inpa.gov.br

Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia
ani.matsuura@fiocruz.br

Juliana Gomes de Souza Oliveira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
juliana.gomes@inpa.gov.br

Luadir Gasparotto
Embrapa Amazônia Ocidental
luadir.gasparotto@embrapa.br

Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto
Universidade Federal de Pernambuco
reginaldo.limaneto@pq.cnpq.br

Liliane Coelho da Rocha
Universidade do Estado do Amazonas
lrocha@uea.edu.br

Sumário

Identificação de fungos: gêneros <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i>	1
<i>Luís Roberto Batista</i> <i>Sirlei Cristina Souza</i> <i>Suzana Reis Evangelista</i> <i>Natasha Lira Azevedo</i>	
Estratégias de prevenção e de descontaminação de fungos toxigênicos e micotoxinas em alimentos	11
<i>Geovana Dagostim Savi</i>	
Micotoxinas na Região Amazônica: passado e futuro	21
<i>Ariane Mendonça Kluczkowski</i> <i>Augusto Junior Kluczkowski</i> <i>Silmara Mundim</i>	
Chilean pepper: Spoilage fungi and mycotoxins contamination risk in <i>Capsicum</i> products	29
<i>Jéssica Costa</i> <i>Nelson Lima</i> <i>Cledir Santos</i>	
Qual a relevância das espécies esporocárpicas na taxonomia e sistemática de Glomeromycota?	41
<i>Khadija Jobim</i> <i>Juliana Luiza Rocha Lima</i> <i>Naasson Victor L. Oliveira</i> <i>Bruno Tomio Goto</i>	
Colonização das raízes de plantas da Amazônia por fungos micorrízicos arbusculares	53
<i>Luiz Antonio Oliveira</i> <i>Francisco Wesen Moreira</i>	
Coccidioidomycose: uma doença negligenciada no Nordeste brasileiro	60
<i>Rossana de Aguiar Cordeiro</i>	
Molecular epidemiology and experimental sporotrichosis: challenges and perspectives	67
<i>Danielly Corrêa-Moreira</i> <i>Cintia de Moraes Borba</i> <i>Thais Guimarães Barreira</i> <i>Rodrigo Caldas Menezes</i> <i>Isabella Dib Gremião</i> <i>Sandro Antonio Pereira</i> <i>Manoel Marques E. Oliveira</i>	
Fungos de um nicho ancestral: fungos fitopatogênicos em pteridófitas no Brasil	75
<i>Eduardo Guatimosim</i> <i>Robert Weingart Barreto</i> <i>Pedro Bond Schwartzburd</i>	
Fungos micorrízicos arbusculares em ambientes aquáticos: o que estamos negligenciando?	87
<i>Mariana Bessa Queiroz</i> <i>Stephania Ruth Basilio S. Gomes</i> <i>Xochitl Margarito Vista</i> <i>Juliana Aparecida Souza Leroy</i> <i>Bruno Tomio Goto</i>	
Macrofungos como indicadores da qualidade do habitat e a mudança climática	97
<i>Maura L. Quezada</i> <i>Roxanda Lopez-Mayorga</i> <i>Rosa Sunum</i> <i>Evangelina Pere-Silva</i> <i>María Papa</i> <i>Juan Pablo Herrera</i> <i>Bianka Hernández</i>	
Descoloração <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de corante reativo pela lacase de fungo de Basidiomiceto	107
<i>Nara Ballaminut</i> <i>Glauciane Danusa Coelho</i> <i>Rafael Trindade Maia</i> <i>Vera Maria Valle Vitali</i> <i>Dácio Roberto Matheus</i>	
A mixobiota de manguezais e a ocupação de microhabitats	116
<i>Laise de Holanda Cavalcanti</i> <i>Leandro de A. Neves N. Agra</i>	

Aspectos ecológicos da mixobiota em diferentes fitofisionomias do Cerrado	125
<i>Solange Xavier Santos</i> <i>Izabel Cristina Moreira</i> <i>Jéssica Conceição Araújo</i> <i>Lucas Leonardo Silva</i>	
Atividade antimicrobiana em metabólitos produzidos por mixomicetos	132
<i>Sheyla Mara de Almeida Ribeiro</i> <i>Nicácio Henrique Silva</i> <i>Eugênia Cristina Pereira</i> <i>Marcio Rubens Ribeiro</i> <i>Laise de Holanda C. Andrade</i>	
Formação de Recursos Humanos em Micologia na Pós-Graduação do Sul do Brasil	139
<i>Elisandro Ricardo D. Santos</i> <i>Marcela Monteiro</i> <i>Wesley Ribeiro Nardes</i> <i>Diogo Henrique Costa Rezende</i>	
Macromicetos Amazônicos: potenciais biotecnológicos de modo sustentável	148
<i>Ceci Sales Campos</i> <i>Larissa Ramos Chevreuil</i>	
Macrofungos comestíveis e medicinais	158
<i>Arailde Fontes Urben</i>	
Fungos corticioides do Brasil: revisão e novidades taxonômicas	165
<i>Carla Rejane Sousa Lira</i> <i>Renata dos Santos Chikowski</i> <i>Vitor Xavier de Lima</i> <i>Karl Henrik Larsson</i> <i>Tatiana Baptista Gilbertoni</i>	
Diversidade de fungos ciferloides no Brasil	175
<i>Larissa Trierveiler-Pereira</i> <i>Greg Thorn</i> <i>Adriana de Mello Gugliotta</i>	
Exposição ambiental a azólicos e seleção de cepas fúngicas resistentes: impacto clínico	182
<i>Danielle Patrícia C. Macêdo</i> <i>Marylia Eduarda do N. Cabral</i> <i>Franz de Assis G. dos Santos</i> <i>Ertênia Paiva Oliveira</i> <i>Reginaldo G. de Lima Neto</i> <i>Rejane Pereira Neves</i>	
Acervos micológicos nos herbários brasileiros: Retratando as diferenças regionais	190
<i>Leonor Costa Maia</i> <i>Tatiana Baptista Gilbertoni</i> <i>Adriana de Mello Gugliotta</i> <i>Lucas Leonardo Silva</i> <i>Izabel Cristina Moreira</i> <i>Rosa Mara Borges da Silveira</i> <i>Helen Maria Pontes Sotão</i> <i>Solange Xavier Santos</i>	
Fungos fitopatogênicos na Amazônia	202
<i>Daniel Augusto Schurt</i> <i>Luadir Gasparotto</i> <i>José Clério Resende Pereira.</i>	
Diversidade de Hypoxylaceae na Amazônia Brasileira: Situação atual e expectativa futura para o estudo da família	208
<i>Kely da Silva Cruz</i> <i>Maria Aparecida Jesus</i> <i>Antônia Queiroz Lima Souza</i> <i>Ceci Sales Campos</i>	

Identificação de fungos: gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*

BATISTA, Luís Roberto¹; SOUZA, Sirlei Cristina², EVANGELISTA, Suzana Reis²; AZEVEDO, Natasha Lira²

1 Professor Associado, Universidade Federal de Lavras

2 Programa de Pós-graduação Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras

Emails: luisrb@ufla.br, sirlei.bio@hotmail.com, suzanareise@gmail.com, nathashalira@yahoo.com.br

Resumo

Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* são bem conhecidos e têm sido estudados ao longo dos séculos, principalmente porque muitas dessas espécies são de importância econômica em diversas áreas. Podem ser utilizados na produção de queijos finos, salames, molho de soja e também são importantes biotecnologicamente, sendo muito utilizados para produção de enzimas. Além disso, esses fungos apresentam uma produção diversificada de metabólitos secundários bioativos, os quais podem ser utilizados medicinalmente como antibióticos ou outros fármacos com importância terapêutica. Porém, algumas espécies também são apontadas como deterioradoras de alimentos, produtoras de toxinas e agentes de algumas doenças humanas e animais. Algumas espécies pertencentes a esses gêneros também são conhecidas por sua capacidade de crescimento em ambientes extremos com altas/baixas temperaturas, altas concentrações de sal/açúcar, baixa acidez ou baixos níveis de oxigênio. Anteriormente, esses gêneros pertenciam a família Trichocomaceae, a qual foi subdividida em várias novas famílias. Atualmente, esses três gêneros estão classificados na família Aspergillaceae e são conhecidos por possuírem impactos positivos e negativos sobre as atividades humanas. Inicialmente os fungos filamentosos eram conhecidos como prejudiciais, sendo apontados como patógenos de humanos, causadores de contaminação e deterioração em alimentos, produtores de toxinas. No entanto, com a evolução das pesquisas, os fungos têm se destacado em suas ações benéficas. Desta forma a Taxonomia se torna uma ferramenta essencial para conhecer e distinguir as espécies que apresentam risco e espécies que são benéficas.

Palavras-chave: Fungos filamentosos, Taxonomia, Diversidade.

1. Introdução

A taxonomia tem como objetivo descrever, identificar e classificar os seres vivos, informando se um organismo pertence ou não ao grupo pré-definido na classificação (Moore *et al.*, 2010). A identificação de fungos foi primeiramente baseada em características micro e macromorfológicas, entretanto esse método esbarra, muitas vezes, em aspectos como pouca variação morfológica entre espécies ou o que se conhece como *espécies crípticas*, um grupo que satisfazem a definição biológica, isto é, são isoladas reprodutivamente entre si, mas são morfológicamente idênticas (Bickford *et al.*, 2007).

As técnicas morfológicas de identificação são de extrema importância, mas precisam estar associadas a outras técnicas para sua validação. Colwell em 1970 sugeriu a ideia de um consórcio de múltiplas técnicas como a melhor forma de se chegar a um resultado mais preciso de identificação, conhecida atualmente como taxonomia polifásica, que envolvem análises fenotípicas, genéticas, fisiológicas químicas e dados ecológicos (Samson e Varga, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009).

A taxonomia dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* vem sendo reavaliada utilizando a taxonomia polifásica, e os dados moleculares são baseados em sequenciamento multilocus de genes conservados como β -tubulina, calmodulina e RNA polymerase II gene (*RPB2*) (Houbraken *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2014; Visagie *et al.*, 2016). A região ITS do rDNA é considerado *barcode* para fungos, e bastante efetivo na separação de gêneros, entretanto a maioria das espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* apresentam pouca ou nenhuma variação em suas sequências e a separação intra-específica apenas pelo *barcode* não é possível (Houbraken *et al.*, 2011; Visagie *et al.*, 2014).

Análise bioquímicas tais como produção de metabólitos secundários é uma importante ferramenta na identificação de fungos, pois são, muitas vezes, capazes de gerar perfis metabólitos únicos para cada espécie. Estudos quimiotaxonomicos de *Talaromyces* (Frisvad *et al.*, 2015) e de *Penicillium* (Frisvad e Filtenborg, 1990; Nielsen *et al.*, 2006) mostraram que parte destes podem ser classificados com base em metabólitos secundários em combinação com morfologia e fisiologia. Da mesma forma espécies de *Aspergillus* possuem perfis altamente específicos de metabólitos e apontam para a mesma espécie de morfologia, fisiologia e dados de sequência de DNA (Frisvad *et al.*, 2008). Entretanto, isolados de *Aspergillus* das seções *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*, por exemplo, produzem um grande número de metabólitos secundários idênticos (Frisvad e Samson, 2000; Frisvad *et al.*, 2004), portanto essa técnica deve ser usada com cautela, pois geralmente, permitem identificação inequívoca em nível de espécies quando usada isoladamente. A melhor maneira de usar extratos como auxiliares de identificação é extrair e separá-los por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e, em seguida, identificar parcial ou totalmente a quantidade de metabólitos secundários possível, geralmente usando tecnologia baseada em espectrometria de massa (Frisvad *et al.*, 2008).

Outra técnica auxiliar é a impressão digital de espectrometria de massa por tempo de voo com dessorção / ionização assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Foi aplicado com sucesso à identificação de bactérias (Siegrist *et al.*, 2007; Angeletti *et al.*, 2017) e espécies de leveduras (Amiri-Eliasi e Fenselau, 2001; Kolecka *et al.*, 2013). Apenas um número limitado de estudos incluídos ou focados em *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* foi realizado por (Welham *et al.*, 2000; Hettick *et al.*, 2011; Chalupová *et al.*, 2014; Normand *et al.*, 2017) e *Aspergillus* (De Carolis *et al.*, 2011; Verwer *et al.*, 2013; Luethy *et al.*, 2018). Embora esses estudos relatem que MALDI-TOF MS permite distinguir entre espécies, observa-se um grande grau de variação dentro de uma mesma espécie, mesmo entre duplicatas da mesma cepa (Shafer *et al.*, 2017). Isso significa que os dados de um alto (Iriart *et al.*, 2012; Verwer *et al.*, 2013). Assim, podemos concluir que, embora essa técnica seja promissora, continua número de tensões que terão de ser incluídos no banco de dados para tornar possíveis identificações robustas. Dificuldades com identificações também são relatadas em *Aspergillus*, onde nem todas as cepas podem ser identificadas com 100% de precisão sendo necessário muito trabalho para tornar possíveis identificações de rotina (Yilmaz *et al.*, 2014).

2. Gênero *Aspergillus*

A família *Trichocomaceae*, até 2011 era composta por diversos gêneros de fungos, nos quais se enquadrava o gênero *Aspergillus*, entretanto em um extenso trabalho feito por Houbraeken e colaboradores, a taxonomia foi reavaliada e essa família foi subdividida em: *Aspergillaceae* (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Hamigera*, *Leiothecium*, *Monascus*, *Penicilliopsis*, *Phialomyces*, *Sclerocleista*, *Warcupiella* e *Xeromyces*), *Trichocomaceae* (*Rasamsonia*, *Sagenomella*, *Talaromyces*, *Thermomyces* e *Trichocoma*) e *Thermoascaceae* (*Bysochlamys*/*Paecilomyces* e *Thermoascus*) (Houbraeken *et al.*, 2011).

Aspergillus foi descrito pela primeira vez pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli em 1729, e a nomenclatura foi dada pela semelhança da sua estrutura reprodutiva assexuada (conidióforo) ao utensílio utilizado em igrejas para orvalhar água benta chamado “Asperges”, mas foi apenas em 1926 que a primeira monografia foi publicada por Tom e Church. Em 1965 Raper e Fennell dividiram as espécies considerando suas características morfológicas, enquanto Gams em 1982 dividiu o gênero em seções (Micheli, 1729; Bennet, 2010; Gibbons e Rokas, 2013).

Durante anos, manuais de identificação morfológicas foram lançados, no intuito de auxiliar a separação das espécies (Thom e Raper, 1945; Klich e Pitt, 1988; Klich, 2002). A taxonomia de *Aspergillus* é complexa e sofre mudanças com o tempo, a cada nova tecnologia de identificação suas espécies vão sendo realocadas, assim como novas espécies são descobertas. A identificação é tradicionalmente baseada na caracterização das culturas e morfológica (Raper e Fennel, 1965; Samson e Varga, 2010), entretanto o perfil bioquímico, genético e ecológico acrescentam informações taxonômicas importantes na abordagem polifásica, que abrange conhecimentos menos limitados em todos os aspectos biológicos destes organismos (Peterson, 2008; Visagie *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

A hifa ereta proveniente da célula pé é denominada conidióforo, o qual se dilata para dar origem a uma forma arredondada ou elíptica, chamada vesícula. Na área fértil da vesícula são formadas células conidiogênicas, métulas e fiáldes que produzem cadeias longas de esporos mitóticos, denominados conídios. Todo este aparato é denominado aspergilli (Figura 1), o qual pode ser bisseriado quando há métulas e fiáldes, ou unisseriado quando apenas fiáldes surgem da vesícula (Bennet, 2010). Além do aspergilli, outras estruturas morfológicas podem auxiliar na identificação do gênero, que são cleistotécios, escleródios e associadas a este, células de Hülle. O cleistotécio e o escleródio são estruturas capsulares, fechadas e esféricas que podem ser abundantes em colônias de algumas espécies de *Aspergillus*. O cleistotécio é característico do estágio sexual reprodutivo e contém ascósporos meióticos no interior do asco. A estrutura escleródio é composta por massa de micélio torneada e sua função está relacionada com a sobrevivência em condições adversas (Bennet, 2010).

A fácil dispersão dos esporos, inclusive a longas distâncias, é uma característica marcante desse gênero, isso se deve as suas estruturas reprodutivas produzem quantidades grandes de esporos leves, além de se adaptarem a diferentes ambiente, mesmo com poucos recursos como água, luz e nutrientes, por exemplo, eles também podem crescer em uma ampla gama de temperatura (6-55°C) e com uma humidade relativamente baixa. Essa capacidade de aerolização e disseminação no ambiente o prioriza em qualquer nicho ecológico (McCormick *et al.*, 2010; Krijghsheld *et al.*, 2013).

A última revisão do gênero *Aspergillus* realizada por Samson *et al.* (2014), sugere que este gênero apresenta até o momento 4 subgêneros: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*, e 23 seções: *Aeni*, *Aspergillus*, *Bispori*, *Candidi*, *Cervini*, *Circumdati*, *Clavati*, *Cremeri*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Jani*, *Nidulantes*, *Nigri*, *Ochraceorosei*, *Raperi*, *Restricti*, *Robusti*, *Silvati*, *Sparsi*, *Terrei*, *Usti* e *Versicolores* (Houbraken *et al.*, 2014; Visagie *et al.*, 2014; Jurjević *et al.*, 2015; Despot *et al.*, 2017; Sklenář *et al.*, 2017).

Aproximadamente, um terço das espécies de *Aspergillus* também possui a forma sexuada descrita. Contudo, com a mudança do novo Código Internacional de Nomeclatura para algas, fungos e plantas, as espécies

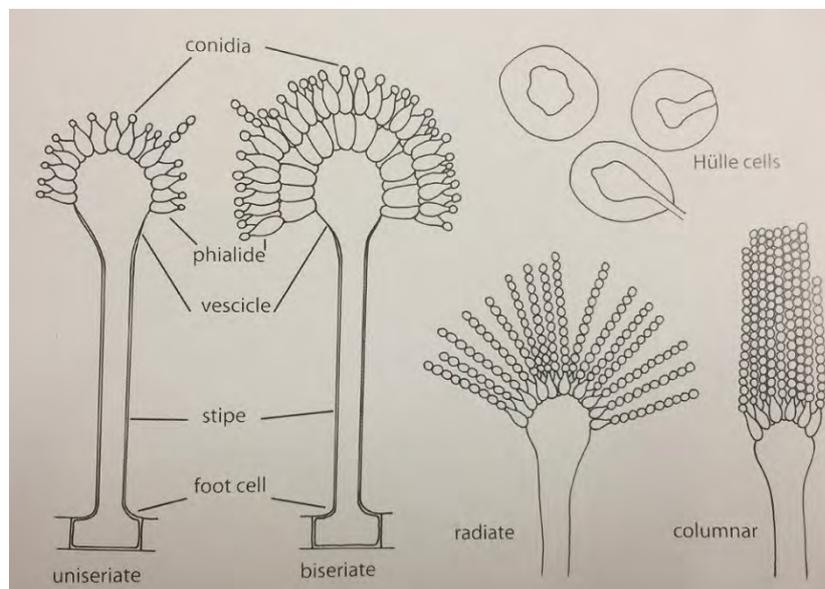


Figura 1. Estrutura morfológica de *Aspergillus*.

Fonte: Samson *et al.* (2010).

telemorfas como *Neosartorya*, *Emericella*, *Eurotium* e *Petromyces* passaram a se enquadrar em um único gênero: *Aspergillus*. Embora tenha sido bastante estudado, a sistemática desse gênero ainda apresenta constantes mudanças devido aos recentes estudos de filogenia molecular e quimiotaxonômicos (Samson e Varga, 2009; Samson *et al.*, 2014).

A identificação correta de *Aspergillus* é muito importante, considerando as identificações errôneas que são muito comuns por se utilizar apenas um método ou falta de experiência com o gênero. Isso também ocorre porque muitas espécies são fenotipicamente idênticas. Por sua vez, estirpes isoladas de tecido humano ou animais, ou armazenados por longos períodos de tempos tendem a ter uma esporulação mais restrita o que pode levar a uma variação na micromorfologia, por exemplo (Latgé, 1999; Samson *et al.*, 2014;). Os *Aspergillus* são bastante diversos, considerados cosmopolitas e amplamente distribuídos na natureza (Klich, 2002). As espécies desse gênero são costumeiramente reconhecidas por deteriorar alimentos (saprófitos), produzir micotoxinas e algumas são frequentemente descritas como patógenos humanos e animais. Além disso, muitas espécies são utilizadas na biotecnologia para a produção de uma variedade de metabólitos, tais como antibióticos, ácidos orgânicos, fármacos, enzimas e como agentes em fermentações (Samson *et al.*, 2014).

3. O gênero *Penicillium*

Assim como *Aspergillus*, o gênero *Penicillium* também se encontra na família *Aspergillaceae*, ordem *Eurotiales*, classe *Eurotiomycetes* e filo *Ascomycota*, e é considerado um dos gêneros mais importantes desse filo. São conhecidos por apresentarem impactos positivos e negativos sobre a vida humanas (Houbraken *et al.*, 2011).

O nome *Penicillium* foi introduzido a primeira vez por Link em 1809, e é derivado de *Penicillus*, que significa “pequeno pincel” em latim. Mas foi apenas em 1901 que Dierckx introduziu os sistemas de subgêneros *Aspergilloides*, *Biverticillium* e *Eupenicillium*. A monografia “The Penicillia” escrita por Thom (1930) foi uma das mais importantes contribuições para o conhecimento desse gênero. Nesse trabalho subdividiu-se o gênero em relação aos tipos de ramificações de suas estruturas reprodutivas assexuadas (conidióforos) e coloração das colônias, delimitando assim 4 subgêneros, 12 seções e 18 subseções (Pitt, 1979).

Embora esse gênero tenha muitas variações de cores e tamanhos, as características básicas são de micélio vegetativo abundante, irregularmente ramificados, septado, hialino ou de cores vivas, formando colônias de micélios densa e compacta com margens bem definidas. Conidióforos provenientes da superfície indiferenciada podendo haver hifas aéreas. Estipes relativamente estreitas e de paredes finas, 2-5 μm e em algumas espécies apicalmente inchadas, hialinas, em algumas espécies marrons. Penicilli composto com um, dois ou raramente mais vértices de métula e ramos como células de suporte, raramente excedendo 15 μm de comprimento, ampulliforme, raramente cilíndrico. Conídio em cadeias não ramificadas, unicelulares, comumente entre 2-5 μm de diâmetro, raramente superior a 6 μm . Colônias coloridas em tons de verde, raramente branca ou marrom. Clamidósporos ausentes. Ocasionalmente produzem escleródios, composto de células de paredes grossas e parenquimatosas. Cleistotécio, às vezes produzido, geralmente duro, globoso a subgloboso amadurecendo do centro para fora e muitas vezes tardiamente, branco, pálido, amarelo, laranja ou marrom, ocasionalmente preto ou vermelho. Ascos de forma elipsoidal a globosa, geralmente de 5-15 μm . Ascósporos lenticular de 2-5 μm geralmente com cristas equatoriais (Raper e Thom, 1949; Houbraken e Samson, 2011) (Figura 2).

São reconhecidas cerca de 360 espécies, subdivididas em quatro subgêneros *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Furcatum* e *Biverticillium*, recentemente os três primeiros foram incluídos no gênero *Penicillium* e *Biverticillium* sob *Talaromyces* e 26 seções *Aspergilloides*, *Brevicompecta*, *Canescentia*, *Charlesii*, *Chrysogena*, *Cinnamopurpurea*,

Citrina, *Digitata*, *Eladia*, *Exilicaulis*, *Fasiculata*, *Fracta*, *Gracilentia*, *Lanata-divaricata*, *Osmophila*, *Paradoxa*, *Penicillium*, *Ramigena*, *Ramosa*, *Robsamsonia*, *Roquefortorum*, *Sclerotiora*, *Stolkia*, *Thysanophora*, *Torulomyces* e *Turbata* (Houbraken e Samson, 2011; Hubka *et al.*, 2015; Houbraken *et al.*, 2016; Perrone, 2017).

A classificação desse gênero não é simples, e a realocação de espécies é comum, a utilização, somente das características morfológicas, levam a muitos erros de identificação. Atualmente, as identificações somente são aceitas quando variados procedimentos de análises (morfológica, moleculares e fisiológicas) são aplicados, essa confluência de técnicas é chamada de taxonomia polifásica, e é imprescindível no estudo da diversidade de *Penicillium* e fungos em geral (Samson *et al.*, 2011; Visagie *et al.*, 2014).

Os *Penicillium* ocorrem de forma generalizada em ambientes terrestres e é encontrado inclusive em ambientes aquáticos. Desde a descoberta da penicilina espécies de *Penicillium* têm sido avaliadas, e com sucesso, quanto à produção de diversificados tipos de metabólitos secundários ativos, incluindo substâncias antibacterianas (Petit

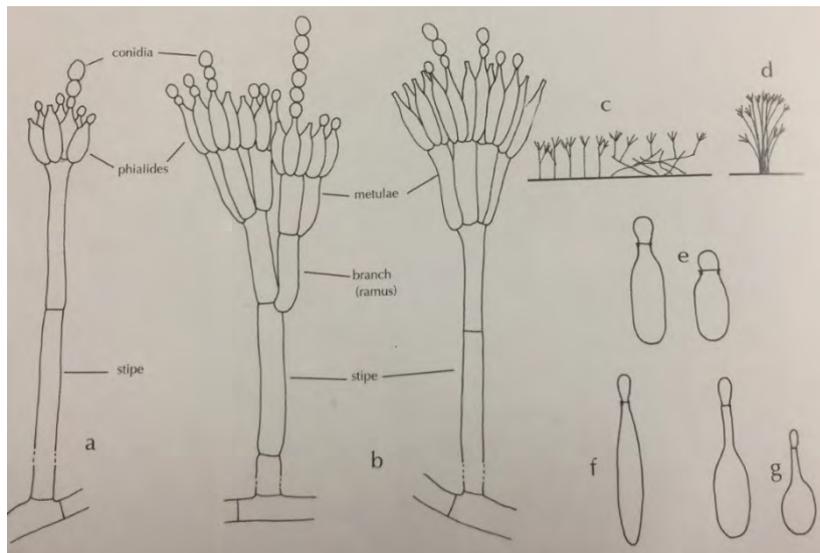


Figura 2. Estrutura morfológica de *Penicillium*.

Fonte: Samson *et al.* (2010).

et al., 2009; Lin *et al.*, 2018), larvicidas (Devarajan *et al.*, 2017), antioxidantes (Yang *et al.*, 2017), antifúngicas (Nicoletti *et al.*, 2007), anti-inflamatórios (Ha *et al.*, 2017), pigmentos (Viggiano *et al.*, 2017; Celestino *et al.*, 2014). Além disso, produzem diversas enzimas de interesse industrial, e algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole (Pallu, 2010; Ahmed, 2018) e produção de alimentos como queijos finos e salames. Muitas dessas espécies, isoladas de solo são fontes de novos produtos inovadores e fármacos.

4. O gênero *Talaromyces*

O gênero *Talaromyces* sempre foi estritamente relacionado a *Penicillium* denominado como sua forma teleomorfa. Foi descrito por Benjamin (1955) e caracterizado por conter cleistotécio macios com as paredes entrelaçadas de hifas e tipicamente amarelos, ascomata com asco ovado e ascósporos globoso com espinhos. Stolk e Samson (1971) apresentaram o gênero *Hamigera* para espécies de *Talaromyces* que produziam asco único, limitando *Talaromyces*, as espécies que produzem ascos em cadeias. Embora Pitt (1980) tenha considerado *Hamigera* sinônimo de *Talaromyces*, Houbraeken e Samson (2011) detalharam em trabalho de filogenia que as espécies de *Talaromyces* termofílicas mostraram serem distintas como *T. byssochlamydoides*, *T. eburneus* e *T. emersonii*, e foram classificados no novo gênero *Rasamsonia* e *Thermomyces* (Benjamin, 1955; Stolk e Samson, 1972; Houbraeken e Samson 2011).

Diversos trabalhos documentaram que o subgênero *Biverticillium* pertencente ao gênero *Penicillium sensu stricto* formam um grupo polifilético (Frisvad e Filtenborg, 1990; Lobuglio *et al.*, 1993; Ogawa *et al.*, 1997; Seifert *et al.*, 2004; Wang e Zhuang, 2007). Houbraeken e Samson (2011), usando uma filogenia de quatro genes, provaram que as espécies de *Biverticillium* e *Talaromyces* formam um clado monofilético, as espécies foram então recombinadas, *Penicillium*, subgênero *Biverticillium* agora percente ao gênero *Talaromyces* (Samson *et al.*, 2011). Com as mudanças no Código Internacional de Nomeclatura para algas, fungos e plantas, as espécies filogeneticamente relacionadas devem ser tratadas sob o mesmo nome independentemente de suas formas sexuadas ou assexuadas (McNeill *et al.*, 2012).

Como base, os *Talaromyces* apresentam colônias em CYA geralmente com reverso amarelo ou vermelho e / ou pigmentos solúveis, sem nenhum crescimento ou crescimento muito restrito, às vezes produz sinnemata. Conidióforos com elementos lisos ou de paredes ásperas, simetricamente biverticilado, com menor proporção de ramos subterminais (em algumas espécies com um único ramo lateral subterminal que depois repete o padrão de ramificação do eixo principal), algumas espécies monoverticiladas ou com polialídeos solitários. Estipes

geralmente hialino, terminando em uma métula espiral de 3-10. Células conidiogênicas filídicas, comprimento aproximadamente igual da métula, tipicamente acerosa. Conídio asseptado, em cadeias basipetas, geralmente elipsoidal a fusiforme, raramente globoso a subgloboso ou ovoidal (Figura 3). Ascómata cleistotecial quando produzido, geralmente com parede macia, com exterior recoberto por hifas, muitas vezes amarela, ocasionalmente branco, creme, rosado, laranja, avermelhado ou verde. Asco produzido em cadeias, contendo oito ascósporos, raramente dois. Ascósporos unicelulares, elipsoidais a globosos, raramente macios, mas muitas vezes com espinhos, hialino a amarelo, ocasionalmente vermelho. Os anamorfos são muito semelhantes aos do *Penicillium* e muitas vezes torna-se difícil diferenciá-los morfológicamente (Yilma *et al.*, 2014).

Com base em análise filogenética multigenes ITS, *BenA* e *RPB2*, foi proposta uma nova classificação para o gênero, colocando as 88 espécies aceitas em sete seções, denominadas seções: *Bacillispori*, *Helici*, *Islandici*, *Purpurei*, *Subinflati*, *Talaromyces* e *Trachyspermi*. Para identificação molecular, o gene *BenA* é proposto como um marcador molecular secundário ao *barcode* ITS (Yilmaz *et al.*, 2014).

Embora raras espécies de *Talaromyces* são importantes patogênicos, causando principalmente doenças pulmonares. *Talaromyces marneffei* é a mais conhecida, e é causadora de uma micose fatal, especialmente em indivíduos imunocomprometidos por HIV (Ustianowski *et al.*, 2008; Mohsin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). *T. marneffei* é a única espécie conhecida dimórfica no gênero, apresentando crescimento filamentoso em 25 °C e uma fase leveduriforme a 37 °C (Andrianopoulos, 2002). *T. purpurogenus* e *T. amestolkiae* também já foram relatados como causadores de doenças pulmonares (Atalay *et al.*, 2016; Villanueva-Lozano *et al.*, 2017).

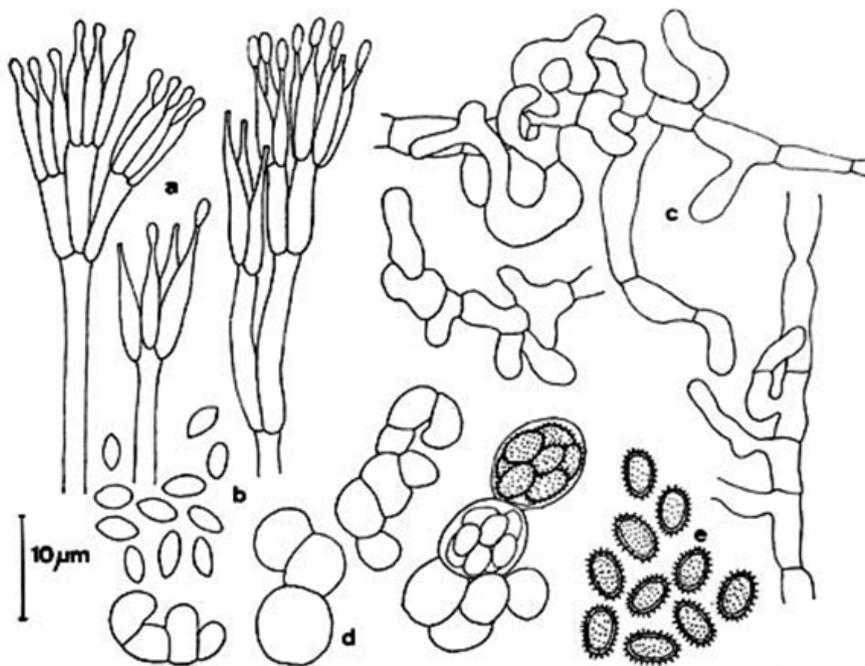


Figura 3. Micromorfologia de *Talaromyces*.

Fonte: Stolk e Samsom (1972) (adaptado).

Entretanto, outras espécies são capazes de produzir substâncias benéficas através de metabólitos secundários como anti-inflamatórios, ácidos, ergosteróis, óleos, antibióticos, pigmentos, entre outros (Frisvad *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016; De Goes *et al.*, 2017; Noinart *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

5. Conclusões

Os gêneros *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Penicillium* são de grande importância para a humanidade, sejam no aspecto positivo (fármacos, biotecnologia, alimentos) ou negativo (deterioração, patogenicidade, toxinas). A contribuição das espécies pertencentes a estes gêneros são observadas dia a dia e as pesquisas em taxonomia irão impactar o nosso cotidiano. Sendo assim, é importante a necessidade utilizar metodologias avançadas, como múltiplos marcadores genéticos e ferramentas analíticas apropriadas para a identificação e classificação destes fungos, é igualmente importante que os micologistas apliquem padrões ou melhores práticas devendo sempre manter-se atualizados com tendências, ferramentas, padrões, recomendações e práticas recentes em taxonomia, especialmente ao descrever novas espécies.

6. Referências

- Ahmed K. 2018. Enhanced Production, Purification and Characterization of Industrial Enzyme by *Penicillium lilacinum* (Thom, 1910). World Academy of Science, *Engineering and Technology, International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 5(1).
- Amiri-Eliasi B., Fenselau C. 2001. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Analytical Chemistry*, 73 (21): 5228-5231.
- Andrianopoulos A. 2002. Control of morphogenesis in the human fungal pathogen *Penicillium marneffei*. *International journal of Medical Microbiology*, 292 (5-6): 331-347.
- Angeletti S. 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of microbiological methods*, 138: 20-29.
- Atalay A., Koc A.N., Akyol G., Cakir N., Kaynar L., Ulu-Kilic A. 2016. Pulmonary infection caused by *Talaromyces purpurogenus* in a patient with multiple myeloma. *Infez Med*, 24(2):153-7.
- Benjamin C.R. 1955. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia*, 47: 669-687.
- Bennet J. W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. [on line] disponível em: <<http://open-access biology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>> Acesso em: 22 jan. 2018.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K., Meier R., Winker K., Ingram K.K., Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3):148-55.
- Celestino J., dos, R., de Carvalho L. E., Lima M. da P., Lima A. M., Ogusku, M. M. & de Souza, J. V. B. 2014. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochem*, 49, 569-575.
- Chalupová J., Raus M., Sedlářová M. 2014. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 32:230-241.
- Chen A.J., Varga J., Frisvad J.C., Jiang X.Z., Sam R.A. 2016. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Cervini*. *Studies in Mycology*, 85: 65-89.
- De Carolis E., Posteraro B., Lass-flörl C. 2011) Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 18:475-484.
- De Goes K.C.G.P, Da Silva J.J., Lovato G.M., Iamanaka B.T., Massi F.P., Andrade D.S. 2017. *Talaromyces sayulitensis*, *Acidiella bohémica* and *Penicillium citrinum* in Brazilian oil shale by-products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(12):1637-1646.
- Jakšić Despot D., Kocsubé S., Bencsik O., Kecskeméti A., Szekeres A., Vágvölgyi C., Varga J. 2017. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycological Progress*, 16: 63.
- Ragavendran C., Mariappan T., Natarajan D. 2017. Larvicidal, histopathological efficacy of *Penicillium daleae* against larvae of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* plus biotoxicity on *Artemia nauplii* a non-target aquatic organism. *Frontiers in pharmacology*, 8: 773.
- Frisvad J.C., Filtenborg O. 1990. *Revision of Penicillium subgenus Furcatum based on secondary metabolites and conventional characters*. In: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Springer US, 159-172p.
- Frisvad J.C., Samson R.A. 2000. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 45:201-208.

- Frisvad J. C.; Samson R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49 (1): 174.
- Frisvad J.C., Yilmaz N., Thrane U., Rasmussen K.B., Houbraken J. Samson R.A. 2013. *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. *PLoS one*, 8 (12): 84102.
- Frisvad J.C., Andersen B., Thrane U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112: (2): 231-240.
- Gams W. 1992. *The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil*. In: W, Winterhoff (Ed.). Fungi in vegetation science, Netherland, Kluwer Academic, 183-223 p.
- Gibbons J.G., Rokas A. 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol.*, 21(1): 14-22.
- Ha T.M., Ko W., Lee S.J., Kim Y.C., Son J.Y., Sohn J.H., Yim J.H., Oh H. 2017. Anti-Inflammatory effects of Curvularin-Type Metabolites from a Marine-Derived Fungal Strain *Penicillium* sp. SF-5859 in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Macrophages. *Marine Drugs*, 15 (9): 282 p.
- Hettick J.M., Green B.J., Buskirk A.D., Slaven J, Kashon, M. L. Beezhold, D.H. 2011. Discrimination of Fungi by MALDI-TOF Mass Spectrometry. In: Fenselau, C., Demirev, P. *Rapid Characterization of Microorganisms by Mass Spectrometry*. ACS Symposium Series, V. 1065. Washington, 35-50p.
- Shafera D., Liu H., Dong J., Liu W., Loft J., Phelps T., Zhang Y. 2017. Comparison of direct smear and chemical extraction methods for MALDI-TOF mass spectrometry identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 1(1): 27-30.
- Houbraken J., López-Quintero C.A., Frisvad J.C., Boekhout T., Theelen B., Franco-Molano A.E., Samson R.A. 2011 a. *Penicillium araracuarensis* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarojense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov., isolated from leaf litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(6): 1462-1475.
- Houbraken J.; De Vries R.P.; Samson R.A. 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol*, 86 (199): 249.
- Houbraken J.; Frisvad J.C.; Samson R. A. 2011. Taxonomy of *penicillium* section *citrina*. *Studies in Mycology*, 70: 53-138.
- Houbraken J., Samson R.A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70: 1-51.
- Hubka V., Nováková A., Kolařík M., Jurjevič Ž., Peterson S.W. 2015. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. *Mycologia*, 107(1): 169-208.
- Iriart X., Lavergne R. A., Fillaux J., Valentin A., Magnaval J. F., Berry A., Cassaing S. 2012. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J. Clin. Microbiol.* 50: 2107–2110.
- Jurjevič Ž. Kubátová, A., Kolařík M., Hubka V. 2015. Taxonomy of *Aspergillus* section *Petersonii* sect. nov. encompassing indoor and soil-borne species with predominant tropical distribution. *Plant Systematics and Evolution*, 301(10): 2441-2462.
- Klich M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Amsterdam: *Centraalbureau voor Schimmelauteurs*, 116 p.
- Klich Maren A.; Pitt John I. 1988. *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs*. Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, Libraries Australia, 116p.
- Kolecka A., Khayhan K., Groenewald M., Theelen B., Arabatzis M., Velegriki A., Kostrzewa M., Mares M., Taj-Aldeen S.J., Boekhout T. 2013. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(8): 2491-2500.
- Krijghsheld P., Bleichrodt R., Van Veluw G., Wang F., Müller W., Dijksterhuis J., Wösten H. 2013. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 74(1): 1-29.
- Latgé J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol*, 12(2): 310–50.
- Lin S., Wu Y.Z., Chen K.Y., Ye J., Yang X. W., Zhang W.D. 2018. Polyketides from the fungus *Penicillium decumbens*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 20(5): 1-6.
- Link H.F. 1809. *Observationes in ordines plantarum naturales*: Dissertatio I. Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin. 3(1): 3-42.

- LoBuglio K.F., Pitt J.I., Taylor J.W. 1993. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia* 85: 592–604.
- Luethy P.M.; Zelazny A.M. 2018. Rapid One-Step Extraction Method for the Identification of Molds using MALDI-TOF MS. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 91(2):130-135.
- Mccormick A., Loeffler J., Ebel F. 2010. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology*, 12(11): 1535-1543.
- Mohsin J., Khalili S.A., Van den Ende A.H.G.G., Khamis F., Petersen E., de Hoog G.S., Meis J.F., Al-Hatmi A.M.S. 2017. Imported Talaromycosis in Oman in Advanced HIV: A Diagnostic Challenge Outside the Endemic Areas. *Mycopathologia*, 182(7-8):739-745.
- Moore E.R., Mihaylova S.A., Vandamme P., Krichevsky M.I., Dijkshoorn L. 2010. Microbial systematics and taxonomy: Relevance for a microbial common. *Research in Microbiology*, 161(6):430-8.
- Nicoletti R.; Lopez-Gresa M. P.; Manzo E.; Carella A.; Ciavatta M. L. 2007. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 163(5): 295-301.
- Nielsen K.F., Sumarah M.W., Frisvad J.C., Miller J.D. 2006. Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10): 3756-3763.
- Noinart J., Buttachon S., Dethoup T., Gales L., Pereira J. A., Urbatzka R., Freitas S, Lee, M, Silva A.M.S., Pinto M.M.M, Vasconcelos V., Kijjoa A. 2017. A New Ergosterol Analog, a New Bis-Anthraquinone and Anti-Obesity Activity of Anthraquinones from the Marine Sponge-Associated Fungus *Talaromyces stipitatus* KUFA 0207. *Marine drugs*, 15(5), 139.
- Normand A. C., Cassagne C., Gautier M., Becker P., Ranque S., Hendrickx M., Piarroux R. 2017. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiology*, 17(1), 25.
- Ogawa H., Yoshimura A., Sugiyama J. 1997. Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia* 89: 756–771.
- Pallu A.P.S. 2010. *Potencial biotecnológico de fungos de gênero Penicillium e interação com cana-de-açúcar*. Piracicaba, Brasil. (Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo USP). 129p.
- Perrone G.; Susca A. *Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins*. 2017. In: Moretti A., Susca A. (eds) *Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, 1542: 107-119.
- Peterson S. W. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, New York, 100(2): 205-226.
- Petit P; Lucas E.; Abreu L.; Pfenning L.; Takahashi J. 2009. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(4): 8-9.
- Pfenning L.H.; Abreu L.M. 2006. *Diversity of microfungi in tropical soils*. In: MOREIRA, F.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSARD, L. (Eds.). *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems*. Wallingford: CABI, 184-205 p.
- Pitt J.I. 1979. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press Inc., England, 634p.
- Pitt J. I.; Hocking, A. D. 1997. *Fungi and food spoilage*. 2 ed. London: Blackie Academic and Professional. 540 p.
- Pitt J.I. (1979). *The Genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. London: Academic Press, 634p.
- Pitt J.I. 1980 *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. London: Academic Press, 148p.
- Raper K. B.; Thom C. 1949. *A manual of the Penicillia*. Baltimore The Williams & Wilkins Company, 920p.
- Raper K.B.; Fennel D.I. 1965. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins, 686 p.
- Ren J., Ding S.S., Zhu A., Cao F., Zhu H.J. 2017. Bioactive Azaphilone Derivatives from the Fungus *Talaromyces aculeatus*. *Journal of Natural Products*, 80(8): 2199-2203
- Rodrigues, P, Venâncio A., Kozakiewicz Z., Lima N. 2009. Polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129 (2): 187-193.
- Samson R. A.; Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, 47: S13-S20.

- Samson R. A. 2010. *Food and Indoor Fungi*. Utrecht (The Netherlands): CBS, 390p.
- Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW, Varga J, Frisvad JC 2011. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud Mycol*, 70(1): 159–83.
- Samso R.A.; Varga J. 2010. *Molecular Systematics and its Teleomorphs. Aspergillus*: Molecular Biology and Genomics, p. 19.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., Frisvad, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173.
- Seifert, K.A., Hoekstra, E.H., Frisvad, J.C.; Louis-Seize, G. 2004. *Penicillium cecidicola*, a new species on cynipid insect galls on *Quercus pacifica* in the western United States. *Studies in Mycology*, 50: 517–523.
- Siegrist TJ., Anderson PD, Huen WH, Kleinheinz GT, McDermott CM, Sandrin TR. 2007. Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Journal of Microbiological Methods*, 68(3): 554–62.
- Sklenář F., Jurjević Ž., Zalar P., Frisvad J. C., Visagie C. M., Kolařík M., Hubka V. 2017. Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section *Restricti*. *Studies in Mycology*, 88, 161–236.
- Stolk A. C.; Samson, R. A. 1972. *The genus Talaromyces: studies on Talaromyces and related genera II*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1221-1223 p.357
- Thom C. 1930. *The penicillia*. Baltimore: Williams & Wilkins, 644p.
- Thom C.; Raper, K. B. A. 1945. *Manual of the Aspergilli*. Bailliere Tindall And Cox.; London, 330p.
- Ustianowski A. P.; Sieu, Tran PM; Day, Jeremy N. 2008. *Penicillium marneffei* infection in HIV. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(1): 31–36.
- Verwer P.E.B., Leeuwen W.B., Girard V. 2013. Discrimination of *Aspergillus lentulus* from *Aspergillus fumigatus* by Raman spectroscopy and MALDI-TOF MS. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*;33: 245–251.
- Viggiano A., Salo O., Ali, H., Szymanski, W.r, Lankhorst, P. P, Nygård, Y., Bovenberg, R.A L, Driessen, A.JM. (2017). Elucidation of the biosynthetic pathway for the production of the pigment chrysogine by *Penicillium chrysogenum*. *Applied and environmental microbiology*, AEM. 02246-17p.
- Villanueva-Lozano H., Treviño-Rangel RJ., Renpenning-Carrasco EW., González GM. (2017). Successful treatment of *Talaromyces amestolkiae* pulmonary infection with voriconazole in an acute lymphoblastic leukemia patient. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 23(6): 400-402.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., Samson, R. A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371.
- Visagie, C.M., Hirooka, Y., Tanney, J.B., Whitfield E., Mwange, K., Meijer, M., Amend, A.S., Seifert, K.A., Samson, R.A. 2014. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*, 78: 63-139.
- Visagie, C. M., Seifert, K. A., Houbraken, J., Samson, R. A., & Jacobs, K. 2016. A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA fungus*, 7(1), 75–117.
- Wang L., Zhuang W.Y. 2007. Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. *BioSystems*, 88: 113–126.
- Zhang, J., Huang, X., Zhang, X., Zhu, Y., Liao, K., Ma, J., Xie, C. 2017. Coinfection of disseminated *Talaromyces marneffei* and *Mycobacteria kansasii* in a patient with papillary thyroid cancer: A case report. *Medicine*, 96(52), e9072.
- Welham KJ1, Domin MA, Johnson K, Jones L, Ashton DS., 2000. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14(5): 307-310.
- Yang Z., hZhu Mei-lin Li De-hai, Zeng R., Han Bing-nan 2017. N-Me-trichodermamide B isolated from *Penicillium janthinellum*, with antioxidant properties through Nrf2-mediated signaling pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 25(24): 6614-6622.
- Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C.; Samson, R.A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 78, 175–341.

Estratégias de prevenção e de descontaminação de fungos toxigênicos e micotoxinas em alimentos

SAVI, Geovana Dagostim

Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brasil. Email: geovanasavi@gmail.com

Resumo

Fungos toxigênicos e micotoxinas são contaminantes persistentes nos alimentos, que causam prejuízos a saúde humana e animal. Com o intuito de evitar a contaminação, estratégias de prevenção e descontaminação são amplamente pesquisadas. O presente trabalho apresenta uma breve descrição de estratégias de prevenção na pré e pós-colheita, assim como métodos de descontaminação de fungos toxigênicos e micotoxinas nos alimentos. Além disso, revisa recentes pesquisas publicadas na literatura referente a tecnologias aplicadas para descontaminação física, química e biológica, destacando suas vantagens e limitações. Sabe-se que mesmo quando todas as medidas preventivas sejam providenciadas durante o cultivo e colheita, e mesmo depois do processamento do alimento na indústria, a eliminação completa das micotoxinas é raramente alcançada. Portanto, métodos de descontaminação são frequentemente testados, bem como novas tecnologias envolvendo esses métodos ainda continuam sendo descobertas. Potenciais métodos são descritos e apresentam forte atividade antifúngica e antimicotoxigênica, no entanto, as limitações persistem principalmente na heterogeneidade entre os estudos, na aplicabilidade em larga escala e na toxicidade de eventuais metabólitos formados durante a degradação da micotoxina. Por isso, as tecnologias ainda são frequentemente discutidas e aperfeiçoadas com o intuito de melhorar a eficiência e reduzir limitações.

Palavras-chave: Culturas alimentares, Colheita, Armazenamento, Contaminantes Tóxicos, Tecnologia.

Introdução

As micotoxinas são metabólitos secundários altamente tóxicos produzidos por fungos toxigênicos. A contaminação dos alimentos pelas micotoxinas é um problema persistente em todo o mundo (Pleadin *et al.*, 2019). Os riscos à saúde são geralmente associados com a ingestão direta dos produtos alimentícios contaminados ou o consumo indireto dos produtos de origem animal. Quando ocorre a ingestão diária frequente de alimentos contendo altos níveis de micotoxinas, os principais efeitos tóxicos são hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, ou até a morte. No entanto, em casos de exposição crônica, os efeitos tóxicos mais comuns são genotoxicidade, carcinogenicidade e distúrbios reprodutivos (Gil-Serna *et al.*, 2019).

Várias estratégias de prevenção e descontaminação são frequentemente desenvolvidas com o intuito de evitar a contaminação dos alimentos pelas micotoxinas. Estes métodos podem ser preventivos ou de descontaminação. As medidas preventivas ocorrem principalmente no período pré-colheita com o intuito de controlar/evitar a produção de micotoxinas pelos fungos toxigênicos, como cultivares resistentes, tempo de colheita, técnicas adequadas de cultivo e semeadura, controle biológico e controle de pragas. No período pós-colheita, medidas preventivas incluem classificação, limpeza, armazenagem adequada com condições de temperatura/umidade controladas e atmosfera modificada. No caso do alimento já estar contaminado com micotoxinas, métodos de descontaminação são usados para a desintoxicação ou degradação da toxina e são principalmente realizados por processos físicos (processos térmicos, irradiação, adsorção), químicos (compostos naturais, ozonização, plasma frio) ou biológicos (microrganismos e enzimas) (Pankaj *et al.*, 2018).

2. Prevenção de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas

O crescimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são influenciados por vários fatores ambientais e práticas agrícolas. A aplicação de produtos agrícolas modernos e tecnologias de fabricação, bem como a regulamentação para micotoxinas em um país auxiliam na prevenção da contaminação dos alimentos. A

análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, assim como as Boas Práticas Agrícolas e as Boas Práticas de Fabricação no período pré e pós-colheita garantem um papel importante na prevenção e manejo de micotoxinas (Alberts *et al.*, 2017).

2.1. Pré-colheita

Algumas medidas preventivas durante período pré-colheita são descritas a seguir (FAO, 2014): a) rotação de culturas; b) remoção das sementes velhas, talos e outros detritos da cultura na terra; c) evitar o estresse da planta por condições inadequadas de água, do solo ou nutritivas; d) cultivo de variedade de sementes resistentes à infestação de pragas; e) plantio de culturas programado; f) espaçamento recomendado entre as plantas; g) minimizar o dano causado por pragas; h) controle de ervas daninhas e i) minimizar os danos mecânicos às plantas e frutas durante o cultivo.

Mesmo quando todas as medidas pré-colheita são seguidas, ainda assim a contaminação por micotoxinas pode ocorrer devido a inúmeros fatores. Portanto, métodos alternativos de prevenção no período de pré-colheita são frequentemente estudados com o intuito de investimento em agricultura sustentável, com foco na redução do uso de agrotóxicos e no desenvolvimento de estratégias alternativas no manejo de pragas. Dentre esses, alguns métodos estudados estão descritos a seguir.

O controle biológico na pré-colheita é usado com o intuito de minimizar a quantidade de patógenos na cultura, com o uso de fungos benéficos competidores. O *Trichoderma* é um dos fungos benéficos mais pesquisados e usados como princípio ativo de biopesticidas comerciais (Sarrocco e Vannacci, 2018). Em estudo de Braun *et al.* (2018), a cepa *Trichoderma harzianum* MRI349 foi usada para competir com importantes fungos fitopatogênicos e produtores de micotoxinas. O estudo mostrou claramente a competição do *T. harzianum* com espécies de *Aspergillus*, reduzindo substancialmente o seu crescimento e a produção de toxinas. O biocontrole a base de cepas não toxigênicas de *Aspergillus* também são usadas para que haja uma competição com cepas toxigênicas. Apesar de recentes estudos terem comprovado que o uso de biocontrole é uma alternativa para reduzir produtos químicos usados no campo, algumas questões ainda são discutidas quanto ao seu uso nas culturas (Alberts *et al.*, 2017). As principais estão relacionadas com a segurança aos trabalhadores e comunidades vizinhas quanto as cepas inoculadas, com o meio-ambiente e o monitoramento constante das toxinas a fim de garantir a segurança alimentar.

Uma outra alternativa é o uso de compostos químicos, como o zinco, que se destaca como um mineral essencial para o organismo humano e animal. Alguns compostos de zinco podem ser utilizados em suplementes alimentares e são considerados seguros para a fortificação de alimentos (ODS, 2011). Estudos têm sido realizados com o objetivo de utilizar o zinco como fortificante nos alimentos devido ao processamento que reduz substancialmente sua concentração (Tripathi *et al.*, 2010).

Em estudo de Savi *et al.* (2015), as plantas de trigo durante período de floração, receberam tratamento com sulfato de zinco ($ZnSO_4$) e nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) nas espiguetas e mostraram reduzir o crescimento de *Fusarium graminearum*. O mesmo ocorreu para a formação de deoxinivalenol, que foi reduzido após o tratamento, sendo que a micotoxina não foi detectada (<LOD) quando as plantas foram tratadas com ZnO-NPs. Além disso, mesmo após aplicação de zinco nas plantas, os níveis deste composto nos grãos colhidos estavam dentro dos níveis recomendados internacionalmente para consumo diário.

As principais limitações dos compostos propostos acima como métodos preventivos estão relacionadas principalmente com o uso em escala industrial e a sua viabilidade econômica, que devem ser amplamente estudados de acordo com a matriz alimentícia, assim como os seus contaminantes.

2.2. Pós-colheita

Medidas preventivas durante período pós-colheita são descritas a seguir (FAO, 2014): a) colheita de grãos com baixo teor de umidade e completa maturidade; b) durante a colheita, assegurar que o equipamento esteja limpo e funcionando adequadamente, assim como vagões e caminhões usados para o transporte dos grãos; c) evitar danos mecânicos aos grãos; d) os cereais devem ser secos o suficiente para evitar o desenvolvimento de fungos (geralmente menos do que 14%); e) grãos, leguminosas e oleaginosas devem ser limpos e classificados, os

materiais estranhos assim como os danificados devem ser removidos; f) as instalações de armazenamento devem ser estruturas secas e bem ventiladas, protegidas de pragas; g) o controle da temperatura e aeração é importante para prevenir o crescimento dos fungos; h) os sacos devem ser limpos e secos, sendo que após enchimento devem ser empilhados em paletes ou em sistemas de impermeabilidade, evitando o contato com o chão e com a umidade; i) os níveis de micotoxinas relevantes para a cultura devem ser monitorados usando amostragem apropriada.

Os primeiros processos após colheita envolvem limpeza, classificação e lavagem, os quais auxiliam na remoção física de micotoxinas. Processos mecanizados geralmente são escolhidos e envolvem equipamentos separadores de ar, peneiras, classificadores de grãos e separadores de gravidade. Oleoginosas e grãos danificados, defeituosos, descorados, fragmentados, quebrados, mofados e matérias estranhas são removidos na classificação, reduzindo significativamente a contaminação por micotoxinas após a seleção e peneiração. A seleção por diferença de densidade também é realizada uma vez que grãos mais leves têm maiores níveis de contaminação que grãos de maior densidade.

O descasque remove as camadas mais externas dos grãos, as quais são as mais afetadas pelos fungos e ao mesmo tempo, possuem maior contaminação por micotoxinas. Por outro lado, a moagem é um processo para quebrar fisicamente os grãos em partículas menores. O processo redistribui as micotoxinas em diferentes frações e geralmente são distribuídas em maiores níveis nas camadas externas (como o farelo, por exemplo) do que em camadas mais internas (como a farinha). O grão inteiro pode apresentar menores níveis do que o farelo do grão, devido às finas partículas criadas principalmente durante a moagem das camadas exteriores dos grãos (Savi *et al.*, 2016b). A preocupação neste caso é principalmente com os produtos destinados ao consumo animal uma vez que recebem essas frações para a sua produção.

Por fim, o local onde o alimento será armazenado antes ou após processamento, deve ser um ambiente monitorado constantemente com relação à temperatura, umidade, odor e manchas. Um dos métodos que podem prevenir a ocorrência de fungos e produção de suas toxinas é a redução da concentração de oxigênio e o aumento de dióxido de carbono ou nitrogênio no ambiente de armazenamento (Sudini *et al.*, 2015).

3. Descontaminação de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas

Mesmo que todos os métodos preventivos sejam realizados a fim de evitar a contaminação por micotoxinas, essas são persistentes nos alimentos processados. Portanto, métodos de descontaminação continuam a ser amplamente estudados e publicados na literatura. A descontaminação pode ocorrer por diferentes métodos, porém qualquer que seja a estratégia de descontaminação, os seguintes critérios básicos devem ser seguidos: a micotoxina deve ser inativada ou destruída por transformação de compostos não tóxicos; esporos fúngicos e micélios devem ser destruídos; o alimento deve manter seu valor nutritivo e permanecer palatável após a descontaminação; e, por último, deve ser economicamente viável. A Tabela 1 apresenta recentes trabalhos publicados na literatura relacionados a descontaminação física, química e biológica de fungos toxigênicos e micotoxinas em alimentos.

3.1. Física

A descontaminação de micotoxinas por métodos físicos incluem vários procedimentos, tais como: processos térmicos, irradiação e adsorção (Tabela 1).

3.1.1. Processos Térmicos

A destruição das micotoxinas devido ao tratamento térmico está relacionado com o nível de contaminação inicial, com a temperatura de aquecimento, tempo de exposição ao calor, tipo de alimento, estrutura da micotoxina, umidade, pH e concentração iônica do alimento. As micotoxinas são muito estáveis e difíceis de eliminar com temperaturas de até 100°C. No entanto, temperaturas mais altas usadas na fritura, torrefação, torragem e extrusão podem auxiliar na redução das micotoxinas. A temperatura de decomposição das moléculas pode variar de acordo com a sua estrutura química (Peng *et al.*, 2018).

A limitação do método usando processos térmicos é a estabilidade da molécula, a qual mesmo em temperaturas altas apresentam resistência a inativação completa. Dependendo do alimento testado, também podem ocorrer mudanças nutricionais e alterações organolépticas.

3.1.2. Irradiação

A irradiação de alimentos mais usada no processamento é a radiação gama proveniente do radioisótopo Cobalto-60. Os raios gama são radiações eletromagnéticas produzidas por elementos radiativos e devido a sua alta energia, têm a vantagem de melhor penetração em meios sólidos e líquidos. A molécula de aflatoxina é resistente ao tratamento direto com radiação gama, no entanto, a degradação da molécula pode ocorrer por efeitos indiretos devido a reações com radicais livres altamente reativos provenientes da radiólise da água e outros componentes (Pankaj *et al.*, 2018).

A irradiação por feixe de elétrons geradas por aceleradores lineares mostrou potencial para aplicação na degradação de moléculas orgânicas complexas por oxidação indireta e por isso tem efeitos semelhantes a radiação gama quando aplicadas em alimentos. As vantagens incluem o tempo mais curto de processamento, a necessidade de pouco aquecimento, o controle da dosagem e o baixo custo do equipamento. O mecanismo de degradação da aflatoxina B₁ em meio aquoso mostra a formação de cinco produtos de degradação, os quais apresentaram significativa redução das propriedades mutagênicas e citotóxicas (Liu *et al.*, 2016).

A radiação ultravioleta (UV) pode ser aplicada como antimicrobiana, as faixas de 210 e 330 nm são eficientes como germicidas por serem absorvidas pelas proteínas e ácidos nucleicos, provocando o rompimento de cromossomo, mutações genéticas, inativação de enzimas e conseqüentemente, a morte da célula. A molécula de aflatoxina B₁ absorve radiação UV em 222, 265 e 362 nm, com a maior absorção ocorrendo a 362 nm, aumentando a sua suscetibilidade à degradação (Pankaj *et al.*, 2018).

As principais limitações das tecnologias de irradiação estão na preocupação quanto ao uso da irradiação ionizante nos alimentos e mudanças nutricionais ocasionadas em algumas proteínas e vitaminas sensíveis a irradiação. Os produtos de degradação também precisam ser melhores estudados quanto ao nível de toxicidade.

3.1.3. Adsorção

Os adsorventes têm sido utilizados em uma ampla gama de aplicações industriais e agrícolas, particularmente na nutrição animal com a finalidade de adsorver micotoxinas, protegendo-os de toxinas presentes em alimentos contaminados. No entanto, a eficiência da adsorção irá depender da distribuição de carga, área de superfície e o tamanho dos poros dos adsorventes, assim como a polaridade e estrutura das micotoxinas (Zhu *et al.*, 2016).

Os adsorventes mais comuns incluem os minerais ou inorgânicos, como aluminossilicatos de sódio e cálcio hidratados, bentonita ou montmorilonita. Essas podem adsorver substâncias em sua superfície ou dentro do seu espaço interlamelar. Outros minerais utilizados incluem tectossilicatos como zeólitas ou carvão ativado (Zhu *et al.*, 2016). Entre os adsorventes inorgânicos, a bentonita recebeu o apoio da Comissão Européia (Nº. 1060/2013) como aditivo alimentar eficaz para ligar-se a micotoxinas, especialmente aflatoxinas (EC, 2013). É importante destacar que para um adsorvente ser aplicado comercialmente junto à alimentação animal, os resultados da avaliação *in vitro* e *in vivo* precisam ser satisfatórios e somente serão liberados para comercialização quando devidamente registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Alberts *et al.*, 2017).

A limitação do tratamento, quando se trata de adsorventes inorgânicos, está relacionada especialmente a baixa eficácia de adsorção com um maior número de toxinas e a interação com nutrientes na alimentação animal.

3.2. Química

A aplicação de muitos dos produtos químicos (bases, ácidos orgânicos) usados como tratamento para a redução de micotoxinas não são permitidos pela Comunidade Européia para alimentação humana e animal (EC, 2006). A limitação desses métodos está relacionada a não-praticidade, insegurança e a diminuição dos níveis nutricionais e do paladar do alimento. Portanto, técnicas que fazem uso de produtos naturais ou agentes

oxidantes que não deixam resíduos nos alimentos são os mais estudados como métodos químicos de descontaminação (Tabela 1).

3.2.1. Óleos essenciais e outros compostos naturais

Plantas medicinais e aromáticas são ricas fontes de óleos essenciais. Essas substâncias pertencem a várias classes de compostos, incluindo aldeídos, terpenos, fenóis, ésteres, álcoois e cetonas. O mecanismo antifúngico desses produtos naturais está relacionado com o rompimento da organização celular da membrana fúngica e com a inibição de algumas enzimas-chave relacionadas ao catabolismo de carboidratos e produção de micotoxina (Hu *et al.*, 2017). As vantagens é que alguns desses compostos naturais são considerados agentes GRAS (geralmente reconhecidos como seguro), produtos biodegradáveis e com baixo risco no desenvolvimento de resistência por microrganismos patogênicos (Parthasarathy *et al.*, 2008).

As limitações do uso de produtos naturais em alimentos estão relacionadas à baixa produtividade desses compostos em larga escala para uso comercial. Além disso, a segurança ainda não é bem estabelecida, sendo que concentrações excessivas não são recomendadas, podendo causar danos à saúde. Também precisam ser avaliadas quanto ao limite máximo de ingestão diária permitido.

3.2.2. Ozônio

O ozônio é um alótropo triatômico composto por três átomos de oxigênio que se formam naturalmente na atmosfera quando as moléculas de oxigênio se rompem devido a radiação ultravioleta e os átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio. Devido a maior estabilidade do oxigênio, a molécula de ozônio sofre um processo de dissociação espontânea com o tempo resultando novamente na formação do oxigênio. O ozônio produzido em escala comercial foi reconhecido como seguro em 1997, sendo que em 26 de junho de 2001, o FDA publicou uma determinação oficial sobre a utilização do ozônio admissível como agente antimicrobiano em alimentos (Guzel-Seydim *et al.*, 2004). O ozônio já mostrou eficiência contra vários microrganismos e potencial para degradar micotoxinas e pesticidas (Savi *et al.*, 2015b; Savi *et al.*, 2016a). O ozônio pode degradar o composto e causar modificações químicas, reduzindo sua atividade biológica. Em fungos pode causar alterações morfológicas, redução na germinação de esporos e aumento de espécies reativas ao oxigênio (Savi e Scussel, 2014).

Como o ozônio já é um gás reconhecido internacionalmente como agente GRAS e que não deixa resíduos nos alimentos, é uma tecnologia bastante explorada na literatura (Zhu, 2018). No entanto, as limitações estão relacionadas principalmente a implementação de alto custo para uso industrial, e as possíveis modificações físico-químicas em alguns alimentos devido à longa exposição ao tratamento.

3.2.3. Plasma frio

O plasma frio é uma tecnologia não térmica, favorável ao meio ambiente que tem potencial para aplicações na indústria alimentícia por não deixar resíduos. O forte campo elétrico usado para geração do plasma frio induz a formação de íons (H^+ , H_3O^+ , O^+ , H^- , O^- , OH^- , N_2^+), espécies moleculares (N_2 , O_2 , O_3 , H_2O_2) e radicais livres ($O\bullet$, $H\bullet$, $OH\bullet$, $NO\bullet$). O plasma frio pode agir sobre estruturas fúngicas, causando deformação no micélio, destruição de proteínas, perda da permeabilidade celular e danos ao DNA da célula (Misra *et al.*, 2019). Com relação a degradação de micotoxinas, Wang *et al.* (2015) propuseram toxicidade reduzida dos produtos de degradação de aflatoxina B_1 após tratamento com plasma frio, provavelmente devido à perda de ligação dupla no anel furânico terminal. A degradação das micotoxinas durante o tratamento com plasma está relacionada à presença de fótons UV, ozônio ou íons reativos e elétrons (Misra *et al.*, 2019).

As limitações estão relacionadas com os produtos de degradação das micotoxinas, os quais precisam ser melhores explorados em termos de toxicidade. Além disso, a viabilidade de uso do plasma em larga escala ainda precisa ser melhor investigada, uma vez que sua eficiência depende de múltiplos parâmetros intrínsecos e extrínsecos, incluindo superfície do alimento, estrutura da micotoxina, tipo de fungos, tempo de vida durante e após tratamento, tempo de tratamento e custo-benefício (Wang, 2015).

3.3. Biológica

O desenvolvimento de métodos biológicos tem o intuito de prevenir os efeitos tóxicos das micotoxinas no organismo. Para isso, uma ampla gama de bactérias, leveduras e fungos capazes de biotransformar ou adsorver as micotoxinas tem sido testada, assim como a aplicação direta de materiais bioativos, como as enzimas (Tabela 1).

3.3.1. Microrganismos

Microrganismos com atividades de desintoxicação são usados no biocontrole de micotoxinas em alimentos, e são encontrados geralmente no solo onde a cultura é cultivada ou no sistema gastrointestinal de animais em contato com as micotoxinas. A coexistência desses microrganismos com as micotoxinas mantém uma pressão seletiva sobre as vias metabólicas envolvidas na tolerância e resistência (Siahmoshteh *et al.*, 2017). A interação de cepas microbianas com as micotoxinas também pode ocorrer. A ligação parece estar associada à parede celular microbiana, incluindo os peptidoglicanos no caso de bactérias e o 1,3- β -glucano, no caso de leveduras. O mecanismo de adsorção das micotoxinas ocorre por meio de paredes celulares inativadas, devido aos polissacarídeos, proteínas e componentes lipídicos que fornecem numerosos locais para a junção com as micotoxinas por meio de ligações de hidrogênio, iônicas e interações hidrofóbicas (Pereyra *et al.*, 2018).

Tabela 1. Relação de publicações referentes à descontaminação de fungos toxigênicos e micotoxinas em alimentos por processos físicos, químicos e biológicos.

Processo	Alimento	Contaminação	Tratamento	Resultados	Referência
Descontaminação Física					
Processo térmico	Farelo de amendoim	AFB ₁ (35,8±1,5 µg/kg)	Extrusão a 150°C	Redução de 77,6±2,2% de AFB ₁ em amostra com 40% de umidade	(Zheng <i>et al.</i> , 2015)
	Pistache	AFB ₁ (383 µg/kg)	Temperatura de 120°C por 1 h com suco de limão e ácido cítrico	Redução de 49 - 93% de AFB ₁	(Rastegar <i>et al.</i> , 2017)
	Peito de frango com ervas (coentro, limão, manjerona, alho, alecrim, salsinha, manjerição, tomilho)	DON, T ₂ , AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ , FB ₁ e FB ₂ , OTA, ZEA (10 mg/L de solução contendo as toxinas)	Temperatura de 200 °C no forno por 5 min ou 350 W no microondas por 0,45 s	Redução de AFB ₁ : 50,7-81,6% no microondas e 59,1-78,6% no forno; AFG ₂ : 46,2-84,6% no microondas e 55,5-82,2% no forno; FB ₁ : 51,9-60,5% no microondas e 56,7-72,2% no forno; FB ₂ : 58,9-70,1% no microondas e 62,4-82,6% no forno; OTA: 60,9-74,9% no microondas	(Sobral <i>et al.</i> , 2019)
Irradiação	Castanha-do-Brasil	<i>Aspergillus flavus</i> (32,9x10 ² UFC/g) AFB ₁ (4,75 µg/kg)	Irradiação por feixe de elétrons 10 kGy Irradiação gama 10 kGy	ND de <i>A. flavus</i> Redução de 65,7% de AFB ₁ ND de <i>A. flavus</i> Redução de 84,1% de AFB ₁	(Assuncao <i>et al.</i> , 2015)
	Óleo de amendoim	AFB ₁ (128 µg/kg)	Ultravioleta 365 nm, por 30 min	Redução de 96% de AFB ₁	(Mao <i>et al.</i> , 2016)
	Farinha de trigo	OTA (93,7 µg/kg)	Irradiação gama 30,5 kGy	Redução de 24% de OTA em amostra com 32% de umidade	(Calado <i>et al.</i> , 2018)
Compostos naturais	Milho	<i>A. flavus</i> (10 ⁶ esporos/mL)	Óleo essencial derivado da Cúrcuma (<i>Curcuma long</i> L.) na concentração de 4 µL/mL	74,3% do milho apresentaram contaminação fúngica com média de produção de AFB ₁ de 116,3 µg/kg nas amostras sem tratamento (controle); 7,5% do milho apresentaram contaminação fúngica com média de produção de AFB ₁ de 7,8 µg/kg nas amostras tratadas com óleo essencial	(Hu <i>et al.</i> , 2017)
	Ameixa vermelha	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. flavus</i> (1x10 ⁶ esporos/mL)	Óleo essencial do dente de alho (<i>Allium sativum</i>). Concentração bactericida mínima de 6,5±1,8 µg/mL para <i>A. flavus</i> e 7,5±0,9 µg/mL para <i>A. niger</i> ; Concentração fungicida mínima de 14±2,1 µg/mL para <i>A. flavus</i> e 14±0,7 µg/mL para <i>A. niger</i> ; Na fruta, a aplicação foi 1,5 vezes maior do que nos estudos realizados <i>in vitro</i>	O melhor resultado ocorreu com a aplicação de óleo essencial do alho (<i>Allium sativum</i>), o qual reduziu o crescimento de <i>A. flavus</i> a níveis abaixo de 2 UFC/g e impediu a deterioração da fruta, mesmo após 10 dias de incubação	(Arasu <i>et al.</i> , 2019)

Tabela 1. Continuação

Processo	Alimento	Contaminação	Tratamento	Resultados	Referência
Descontaminação Física					
Ozônio	Uvas para vinho	Leveduras $\cong 1 \times 10^2$ UFC/g Fungos $\cong 5 \times 10^1$ UFC/g	Ozônio 1,5 g/h por 18 horas a temperatura de 10°C	Redução de fungos e leveduras em 50%, sem afetar polifenóis e caratenóides	(Botondi <i>et al.</i> , 2015)
	Grãos de trigo	<i>A. flavus</i> (44x10 ¹ UFC/g) <i>Penicillium citrinum</i> (25,9x10 ¹ UFC/g) AFB ₁ (231,88 µg/kg) CTR (173,51 µg/kg)	60 µmol/mol por 180 min	ND para ambos os fungos Redução de 94,6% de AFB ₁ e 75,3% de CTR	(Savi <i>et al.</i> , 2015b)
	Sementes de trigo	Fungos (1,87 UFC/g de contagem total inicial)	Temperatura do ar de secagem de 50°C; velocidade do ar de secagem e ozonização com valor de 0,50 ± 0,1 m/s	Redução de 92,9% por 45 min, não influencia na qualidade em termos de germinação, vigor e condutividade	(Granella <i>et al.</i> , 2018)
Plasma frio	Milho	AFB ₁ (420 µg/kg)	Plasma frio com alta voltagem atmosférica 200 W, 90 kV, frequência 50 Hz	Degradação de AFB ₁ em 62% e 82% por 1 min e 10 min de tratamento com umidade relativa do ar de 40%	(Shi <i>et al.</i> , 2017)
	Trigo e Cevada	<i>P. verrucosum</i> (8 - 9 log ₁₀ UFC/mL)	Plasma frio atmosférico com sistema de descarga de barreira dielétrica, pressão de 1atm; gás: ar atmosférico, voltagem 80 kV, frequência 50 Hz	Redução de fungos na superfície da cevada por 2,1 log ₁₀ UFC/g e na superfície do trigo por 2,5 log ₁₀ UFC/g após 20 min de exposição direta	(Los <i>et al.</i> , 2018)
Plasma frio	Avelã	<i>Aspergillus parasiticus</i> (7,9±0,1 log UFC/g) <i>A. flavus</i> (7,8±0,1 log UFC/g)	Sistema de plasma de baixa pressão, 100 W por 30 min	Redução de esporos até 5,6 e 4,7 log UFC/g de <i>A. parasiticus</i> e <i>A. flavus</i> , respectivamente	(Sen <i>et al.</i> , 2019)
			Sistema de plasma de pressão atmosférica, fluxo de gás de 3000 L/h, frequência de 25 kHz e voltagem de 100% (655 W) por 5 ciclos (1,7 min)	Redução de 5,5 e 5,4 log UFC/g de <i>A. parasiticus</i> e <i>A. flavus</i> , respectivamente	
Microorganismo	Pistache	<i>A. parasiticus</i> (10 ⁵ esporos/mL)	<i>Bacillus subtilis</i> (10 ⁹ UFC/mL), a 30°C, 85% de umidade relativa	Redução de 2 log de <i>A. parasiticus</i> em até 8 dias e de 52,5% de AFB ₁ produzida em 8 dias	(Siahmoshteh <i>et al.</i> , 2017)
	Leite	AFB ₁ , OTA e ZEA (1 µg/mL)	Microrganismos do kefir: bactérias ácido lácticas (8,4x10 ⁷ UFC/mL) e leveduras (1,5x10 ⁹ UFC/mL)	Adsorção de 82% de AFB ₁ , 94% de OTA e 100% de ZEA por microrganismos do kefir (principais: <i>Lactobacillus kefirii</i> , <i>Kazachstania servazzii</i> e <i>Acetobacter syzygii</i>)	(Taheur <i>et al.</i> , 2017)
Enzima	Suco de maçã	Patulina (1mg/L)	Enzima orotatofosforibosil transferase proveniente de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 0,15g/L, 25°C em 18 horas	Degradação da PAT em 80% no suco de maçã	(Tang <i>et al.</i> , 2019)

Abreviações: Aflatoxinas (AFLs) B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁); Ocratoxina (OTA); Zearalenona (ZEA); DON (deoxinivalenol); Fumonisinias B₁ e B₂ (FB₁ e FB₂); Citrinina (CTR); Patulina (PAT); Não detectado (ND).

As limitações do uso deste método estão relacionadas a baixa eficiência quando a degradação de várias micotoxinas é necessária, assim como a falta de conhecimento da toxicidade dos metabólitos formados pela degradação da molécula. Além disso, a maioria dos métodos biológicos é eficaz em estudos *in vitro*, no entanto, na cadeia alimentar a sua eficiência ainda precisa ser melhor explorada (Patriarca e Fernández Pinto, 2017).

3.3.2. Enzimas

A substituição de microrganismos por suas enzimas como ferramentas de desintoxicação é uma estratégia atraente para biodegradar micotoxinas, devido a maior segurança, especificidade e facilidade de manuseio em

comparação com microrganismos (Patriarca e Fernández Pinto, 2017). A modificação na estrutura química das micotoxinas está relacionada com a clivagem enzimática ou ligações químicas que desempenham papel fundamental durante a citotoxicidade. Atividades enzimáticas degradando patulina foram encontradas em espécie de levedura, sendo que os produtos de degradação foram menos tóxicos (Zhu *et al.*, 2015).

As limitações do método podem ser comparadas com as do uso de microrganismos, devido especialmente a falta de conhecimento quanto sua eficiência na cadeia alimentar e a segurança toxicológica dos metabólitos formados.

4. Conclusões

A ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar é uma preocupação persistente na indústria de alimentos. Várias são as estratégias eficazes que podem prevenir sua formação, assim como descontaminá-las quando já estão presentes nos alimentos. A aceitação das tecnologias aplicadas para este fim precisa garantir a segurança alimentar, considerando que os produtos de degradação sejam conhecidos, assim como a toxicidade testada. Também precisam preservar a qualidade nutricional e as características organolépticas e por fim, ser de baixo custo, fácil aplicação e eficazes a nível industrial. O uso de novas tecnologias que cumpram com estes requisitos, assim como ajustes necessários para as tecnologias já existentes com o intuito de reduzir suas limitações, são considerados alvos ideais para aplicação na indústria alimentícia.

5. Referências

- Alberts J. F., Lilly M., Rheeder J. P., Burger H. M., Shephard G. S., Gelderblom W. C. A. 2017. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. *Food Control*, 73: 101-109.
- Amer S. A., Kishawy A. T. Y., ELseddawy N. M., Abd El-Hack M. E. 2018. Impacts of bentonite supplementation on growth, carcass traits, nutrient digestibility, and histopathology of certain organs of rabbits fed diet naturally contaminated with aflatoxin. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 25 (2):1340-1349.
- Arasu M. V., Viayaraghavan P., Ilavenil S., Al-Dhabi N. A., Choi K. C. 2019. Essential oil of four medicinal plants and protective properties in plum fruits against the spoilage bacteria and fungi. *Ind. Crops Prod.*, 133:54-62.
- Assuncao E., Reis T. A., Baquiao A. C., Correa B. 2015. Effects of Gamma and Electron Beam Radiation on Brazil Nuts Artificially Inoculated with *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.*, 78(7): 1397-1401.
- Barral B., Chillet M., Minier J., Léchaudel M., Schorr-Galindo S. 2017. Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. *Fungal Biol.*, 121(12):1045-53.
- Botondi R., De Sanctis F., Moscatelli N., Vettriano A. M., Catelli C., Mencarelli F. 2015. Ozone fumigation for safety and quality of wine grapes in postharvest dehydration. *Food Chem.*, 188: 641-7.
- Braun H., Woitsch L., Hetzer B., Geisen R., Zange B., Schmidt-Heydt M. 2018. *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.*, 280:10-16.
- Calado T., Fernandez-Cruz M. L., Cabo Verde S., Venancio A., Abrunhosa L. 2018. Gamma irradiation effects on ochratoxin A: Degradation, cytotoxicity and application in food. *Food Chem.*, 240:463-471.
- EC. 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L364:5-24.
- EC. 2013. Commission Implementing Regulation (EU) N° 1060/2013 of 29 October 2013 concerning the authorisation of bentonite as a feed additive for all animal species. *Off. J. Eur. Union*, L 289/33:33-37.
- FAO. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex Alimentarius. International Food Standards. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Mycotoxin Contamination in Cereals. CAC/RCP 51-2003. Revised 2014, Roma.
- Gil-Serna J., Vázquez C., Patiño B. (2019). Mycotoxins | Toxicology, Reference Module in Food Science. Elsevier.

- Gouda, G.A.; Khattab H. M., Abdel-Wahhab M. A., Abo El-Nor S. A., El-Sayed H. M., Kholif S. M. 2019. Clay minerals as sorbents for mycotoxins in lactating goat's diets: Intake, digestibility, blood chemistry, ruminal fermentation, milk yield and composition, and milk aflatoxin M₁ content. *Small Rumin. Res.*, 175:15-22.
- Granella S. J., Christ D., Werncke I., Bechlin T. R., Machado Coelho S. R. 2018. Effect of drying and ozonation process on naturally contaminated wheat seeds. *J. Cereal Sci.*, 80:205-11.
- Guzel-Seydim Z. B., Greene A. K., Seydim A. C. 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Sci. Technol.*, 37(4):453-60.
- Hu Y., Zhang J., Kong W., Zhao G., Yang M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chem.*, 220:1-8.
- Liu R., Wang R., Lu J., Chang M., Jin Q., Du Z., Wang S., Li Q., Wang X. 2016. Degradation of AFB₁ in aqueous medium by electron beam irradiation: Kinetics, pathway and toxicology. *Food Control*, 66:151-57.
- Los Ziuzina D., Akkermans S., Boehm D., Cullen P. J., Van Impe J., Bourke P. 2018. Improving microbiological safety and quality characteristics of wheat and barley by high voltage atmospheric cold plasma closed processing. *Food Res. Int.*, 106:509-21.
- Mao He B., Zhang L., Li P., Zhang Q., Ding X., Zhang W. 2016. A Structure Identification and Toxicity Assessment of the Degradation Products of Aflatoxin B₁ in Peanut Oil under UV Irradiation. *Toxins (Basel)*, 8(11):332.
- Misra N. N., Yadav B., Roopesh M. S., Jo C. 2019. Cold Plasma for Effective Fungal and Mycotoxin Control in Foods: Mechanisms, Inactivation Effects, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 18(1):106-20.
- Mohaghegh A., Chamani M., Shivazad M., Sadeghi A. A., Afzali N. 2017. Effect of esterified glucomannan on broilers exposed to natural mycotoxin-contaminated diets. *J. Appl. Anim. Res.*, 45 (1):285-91.
- ODS. 2011. Office of Dietary Supplements (National Institute of Health). Dietary Supplement Facts Sheet Zinc.
- Pankaj S. K., Shi H., Keener K. M. 2018. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends Food Sci. Technol.*, 71:73-83.
- Parthasarathy V. A., Chempakam B., Zachariah T. J. 2008. Chemistry of Spices, CABI, Oxfordshire, United Kingdom (U.K.).
- Patriarca A., Fernández Pinto V. 2017. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Curr. Opin. Food Sci.*, 14:50-60.
- Peng W. X., Marchal J. L. M., van der Poel A. F. B. 2018. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 237:129-53.
- Pereyra C. M., Gil S., Cristofolini A., Bonci M., Makita M., Monge M. P., Montenegro M. A., Cavaglieri L. R. 2018. The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B₁ adsorption process. *Food Res. Int.*, 111:306-13.
- Pleadin J., Frece J., Markov K. 2019. Mycotoxins in food and feed, *Adv. Food Nutr. Res.* Academic Press.
- Rastegar H., Shoeibi S., Yazdanpanah H., Amirahmadi M., Khaneghah A. M., Campagnollo F. B., S. Sant'Ana A. 2017. Removal of aflatoxin B₁ by roasting with lemon juice and/or citric acid in contaminated pistachio nuts. *Food Control*, 71:279-84.
- Sarrocchio S., Vannacci G. 2018. Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. *Crop Protect.*, 110:160-70.
- Savi G. D., Piacentini K. C., Bortolotto T., Scussel V. M. 2016a. Degradation of bifenthrin and pirimiphos-methyl residues in stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.) by ozonation. *Food Chem.*, 203:246-51.
- Savi G. D., Piacentini K. C., de Souza S. R., Costa M. E. B., Santos C. M. R., Scussel V. M. 2015a. Efficacy of zinc compounds in controlling Fusarium head blight and deoxynivalenol formation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Food Microbiol.*, 205:98-104.
- Savi G. D., Piacentini K. C., Marchi D., Scussel V. M. 2016b. Fumonisin B₁ and B₂ in the corn-milling process and corn-based products, and evaluation of estimated daily intake. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 33(2):339-45.

- Savi G. D., Piacentini K. C., Scussel V. M. 2015b. Ozone Treatment Efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* Growth Inhibition and Mycotoxin Degradation of Stored Wheat Grains (*Triticum aestivum* L.). *J. Food Process. Preserv.*, 39(6):940-48.
- Savi G. D., Scussel V. M. 2014. Effects of Ozone Gas Exposure on Toxigenic Fungi Species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* Genera. *Ozone: Sci. Eng.*, 36(2):144-52.
- Sen Y., Onal-Ulusoy B., Mutlu M. 2019. *Aspergillus* decontamination in hazelnuts: Evaluation of atmospheric and low-pressure plasma technology. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* In press.
- Shi H., Ileleji K., Strohshine R. L., Keener K., Jensen J. L. 2017. Reduction of Aflatoxin in Corn by High Voltage Atmospheric Cold Plasma. *Food Bioproc. Tec.*, 10(6):1042-52.
- Siahmoshteh F., Siciliano I., Banani H., Hamidi-Esfahani Z., Razzaghi-Abyaneh M., Gullino M. L., Spadaro D. 2017. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. *Int. J. Food Microbiol.*, 254:47-53.
- Sobral M. M. C., Cunha S. C., Faria M. A., Martins Z. E., Ferreira I. M. P. L. V. O. 2019. Influence of oven and microwave cooking with the addition of herbs on the exposure to multi-mycotoxins from chicken breast muscle. *Food Chem.*, 276:274-84.
- Sudini H., Ranga Rao G. V., Gowda C. L. L., Chandrika R., Margam V., Rathore A., Murdock L. L. 2015. Purdue Improved Crop Storage (PICS) bags for safe storage of groundnuts. *J. Stored Prod. Res.*, 64:133-38.
- Taheur Taheur F. B., Fedhila K., Chaieb K., Kouidhi B., Bakhrouf A., Abrunhosa L. 2017. Adsorption of aflatoxin B₁, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *Int. J. Food Microbiol.*, 251:1-7.
- Tang H., Li X., Zhang F., Meng X., Liu B. 2019. Biodegradation of the mycotoxin patulin in apple juice by Orotate phosphoribosyltransferase from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Control*, 100:158-64.
- Tripathi B., Chetana, Platel K. 2010. Fortification of sorghum (*Sorghum vulgare*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) flour with zinc. *J. Trace Elem. Med Biol.*, 24(4):257-62.
- Wang S-Q., Huang, G-Q., Li, Y-P., Xiao, J-X., Zhang, Y., Jiang, W.L. 2015. Degradation of aflatoxin B₁ by low-temperature radio frequency plasma and degradation product elucidation. *Eur. Food Res. Technol.*, 241(1):103-13.
- Zheng H., Wei S., Xu Y., Fan M. 2015. Reduction of aflatoxin B₁ in peanut meal by extrusion cooking. *LWT - Food Sci. Technol.*, 64(2):515-19.
- Zhu F. 2018. Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chem.*, 264:358-66
- Zhu R., Feussner K., Wu T., Yan F., Karlovsky P., Zheng X. 2015. Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Food Chem.*, 179:1-5.
- Zhu Y., Hassan Y. I., Watts C., Zhou T. 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients-A review of recent patents. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 216:19-29.

Micotoxinas na Região Amazônica: passado e futuro

KLUCZKOVSKI, Ariane Mendonça¹, KLUCZKOVSKI JUNIOR, Augusto², MUNDIM, Silmara³

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas

² Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas

³ FAMETRO-Centro Universitário

Emails: ariane@ufam.edu.br; augustokjr@hotmail.com; silmaramundim@hotmail.com

Resumo

Fatores ambientais da região Amazônica associados ao armazenamento/transporte inadequado de alimentos podem propiciar as condições ideais para que fungos toxigênicos produzam micotoxinas que são metabólitos cancerígenos ao homem e animais. Nesse contexto, alimentos Amazônicos com baixo teor de água e considerados matérias-primas tradicionais como a farinha de peixe e farinha de mandioca foram os primeiros estudados associados à presença de fungos toxigênicos, e em especial a castanha-do-Brasil pelo impacto econômico que a contaminação por micotoxinas causou com perda de mercados. No entanto, atualmente a tendência das pesquisas tem foco não somente no estudo da ocorrência da contaminação, mas também em mecanismos de detoxificação e na análise de risco quanto ao consumo desses alimentos em diferentes cenários de consumo e os efeitos na saúde. Essa tendência é exemplificada pela utilização de testes com biomarcadores para micotoxinas em relação ao consumo de alimentos contaminados. Portanto o futuro para a prevenção de micotoxinas em alimentos da Amazônia inclui aplicar estratégias de gerenciamento das condições ambientais, a aplicação de boas práticas de manejo e armazenamento e transporte adequadas, e também como tecnologias alternativas de desidratação e detoxificação desde que acessíveis ao produtor/extrativista. Tais condições poderão auxiliar a manter a segurança dos alimentos e garantir a competitividade comercial dos produtos cultivados e exportados, garantindo assim alimentos seguros ao consumidor do ponto de vista toxicológico, de forma a contribuir com a sustentabilidade de várias cadeias produtivas da Floresta Amazônica.

Palavras-Chave: *Aspergillus*, Aflatoxinas, Castanha-do-Brasil, Mandioca, Piracuí.

1. Introdução

Diversos alimentos da região Amazônica são diretamente afetados pelos fatores ambientais e ações na pré e pós-colheita que podem causar a contaminação por fungos toxigênicos produtores de micotoxinas. No passado com intuito de reduzir essas perdas e também investigar patologias associadas ao consumo de alimentos foram iniciados estudos de micotoxinas em alimentos Amazônicos. Após intensas pesquisas principalmente com a castanha-do-Brasil, a tendência atual é avaliar o risco de consumo e o impacto na saúde bem como tecnologias para prevenir ou inibir as micotoxinas.

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas (AFL) são as mais estudadas e produzidas no metabolismo secundário de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. As principais AFL são agentes tóxicos classificados segundo a fluorescência sob a luz Ultravioleta, sendo a aflatoxina B1 (AFB1), o composto considerado mais tóxico. A ingestão de micotoxinas presentes em alimentos pode passar despercebida ou causar desconforto, como náuseas, em pequenas quantidades. O consumo crônico (ingestão frequente de alimentos com baixos teores de AFL por tempo prolongado) pode favorecer o surgimento do carcinoma hepatocelular ou outras doenças hepáticas.

No passado as AFL já foram apontadas na contribuição de possíveis micotoxinas ingeridas na alimentação da região Amazônica. Na década de 60 durante o estudo das hepatites virais na região Amazônica foram diagnosticados exames histológicos de três amostras de fígado de casos ocorridos em 1965, 1966 e 1967, e o consenso entre os pesquisadores foi de que as alterações patológicas não eram compatíveis com hepatites virais. As lesões sugeriam preferivelmente o envolvimento de um agente tóxico. Em 1968 foram analisadas amostras de alimentos e a presença de AFL e o primeiro alimento estudado foi a farinha de mandioca, com alegação de “ser de mais

provável contaminação devido na região, ter que ser estocada por longos períodos. Também foi considerada a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) por ter sido impedida de entrar nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) sob o fundamento de contaminação de AFL acima do compatível com a saúde humana (Bensabatah e Soares, 2004).

A produção de alimentos na Amazônia, especialmente os de origem extrativista, ocorre em condições ambientais de períodos de seca ou cheia dos rios, por vezes com chuva intensa em que a umidade relativa e as temperaturas são ideais para diversos fungos produzirem as micotoxinas, por exemplo em temperaturas médias $>30^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR%) $>60\%$. Os fungos podem produzir as AFL em qualquer etapa do seu processamento, o que torna as micotoxinas uma questão de saúde pública, uma vez que a ingestão desses metabólitos pode causar efeitos adversos a saúde (Bando *et al.*, 2007; Caldas *et al.*, 2002). Além da castanha, a farinha de mandioca e o guaraná possuem expressão comercial e a avaliação da presença de micotoxinas foi estudada. No guaraná por exemplo, apesar de haver fungos toxigênicos não foi detectada a presença de ocratoxina A e os autores relacionaram com o teor de cafeína das amostras (Martins *et al.*, 2014). Na área de produtos de origem animal as farinhas de peixe e os queijos da região tem dados que podem contribuir com a segurança do consumidor. Kluczkovski *et al.* (2019) avaliaram amostras de queijo produzidas no Estado do Amazonas e não foi detectada AFLM1, metabólito fúngico animal excretado no leite em caso de alimentação contaminada pelo rebanho. Os autores citam como possível explicação para os resultados que maior parte da alimentação do rebanho bovino no Estado do Amazonas ocorre no pasto e não com ração, que por sua vez em outros trabalhos foi relacionada com as micotoxinas.

Nesse contexto de busca de entendimento das fontes de contaminação e mecanismos de prevenção das micotoxinas, está a aplicação de Boas Práticas de manejo nos alimentos extrativistas e nos industrializados programas de segurança de alimentos, envolvendo técnicas adequadas de pré e pós colheita, com atenção às exigências nos aspectos sanitários que dificultem/evitem a produção de micotoxinas, especialmente no controle do teor de umidade e de atividade de água (A_w) do alimento. Além disso, atualmente a questão das mudanças climáticas passou também a ser observada já que naturalmente as áreas de castanhais nativos por exemplo, tem diferença no volume de produção a cada ano influenciada por fatores que também incluem a temperatura e UR% e que podem afetar o volume de produção da castanha e de fungos, como consequência também de micotoxinas.

Tecnologias de detoxificação e atmosfera modificada tem sido testadas. Como exemplo podemos citar a utilização de ozônio em castanha (Giordano *et al.*, 2012) e materiais de embalagem com utilização de vácuo em que provavelmente pela ausência de oxigênio há controle de crescimento fúngico e aumenta a vida-de-prateleira do produto (Lorini *et al.*, 2018). A radiação gama e o feixe eletros também já foram testados em amostras de castanha-do-Brasil contaminadas com *A. flavus* e os resultados destacaram que os processos de irradiação (doses de 5 e 10 kGy) mostraram eficiência na eliminação de *A. flavus* e AFL (Assunção *et al.*, 2015).

A tendência após as pesquisas encontrarem evidências objetivas da contaminação tem sido buscar quantificar o risco ao consumidor quanto aos produtos Amazônicos e a contaminação por micotoxinas. No caso de AFL, por exemplo, os biomarcadores têm sido utilizados para avaliar a exposição de grupos populacionais ao agente tóxico, pois medem uma mudança celular, biológica ou molecular em um meio biológico (tecidos humanos, células ou fluidos) que fornece informação a respeito de uma doença ou exposição a uma determinada substância. Isso já tem sido aplicado com ênfase no consumo de outras nozes de árvores, como por exemplo o amendoim (Jager *et al.*, 2014). Portanto, apresentamos a seguir estudos que envolvem alguns alimentos Amazônicos e relação com micotoxinas:

2. Castanha-do-Brasil

Desde o século XX que a castanha-do-Brasil representa uma importante *commodity* para a região Norte brasileira e cujas pesquisas visavam reduzir “a podridão” relatada nos navios que a exportavam aos portos europeus, já indicando a contaminação por fungos e possíveis perdas comerciais. A partir da década de 80 com estudos de órgãos governamentais, a aplicação do conhecimento técnico à cadeia produtiva da castanha passou a ser mais intensa. Algumas questões do passado poderiam ser consideradas como bases para preservação, envolvendo temas como a delimitação das Reservas Extrativistas que são áreas legalmente protegidas e cujos castanhais devem

continuar preservados. Em 1977 foi sugerida a inclusão da castanha nas formulações de indústrias de alimentos fornecendo incentivos fiscais.

Atualmente as discussões sobre mercado da castanha-do-Brasil tratam da necessidade de resgatar o mercado perdido para a Bolívia com ênfase nas recentes melhorias nas práticas da cadeia produtiva em função do rechaço ocorrido em 2003 de castanha proveniente do Brasil que não atendia os padrões sanitários da União Europeia e o impacto negativo no comércio nacional, passando a Bolívia a ser o maior produtor (Coslovsky, 2014). Desde o episódio, as ações das usinas, governo e instituições de pesquisa iniciaram os esforços em reduzir os níveis de AFL e melhorias nos aspectos de segurança da matéria-prima. Isso é confirmado nos dados oficiais brasileiros do Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal - PNCRC/vegetal (Brasil, 2008) em que em amostras coletadas tem demonstrado continuamente índices favoráveis de amostras conformes, nos períodos de 2013-2014 (88,13%) e de 2015 a 2016 (88,48%).

Quanto à produção, exigia-se no passado que ainda na coleta na floresta houvessem medidas de proteção à castanha e atualmente várias localidades têm aplicado metodologias de Boas Práticas de Manejo, que envolvem práticas adequadas desde a coleta e armazenamento com desidratação ainda nas comunidades. A importância significativa das etapas de manejo adequado é reforçada por trabalhos que citam que as amostras obtidas na Floresta estavam mais susceptíveis à contaminação por AFL (Calderari *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013). Silva *et al.* (2018) citam que a capacitação foi fundamental para reduzir e eliminar AFL em comunidade coletora no Estado do Mato Grosso, sendo, portanto, necessária a aplicação e controles efetivos ainda na floresta.

Já nas usinas, as técnicas de secagem têm sido aprimoradas e a velocidade de processamento e modelos de exaustão, embalagem com atmosfera modificada e seleção óptica têm sido aplicadas (Da Costa *et al.*, 2017; De Melo e Scussel, 2007). Apesar de ser nutricionalmente rica e consumida por diversos públicos (Kluczkowski *et al.*, 2015) a castanha-do-Brasil possui vários estudos sobre a ocorrência de AFL em que tanto a casca quanto a amêndoa demonstraram ser passíveis de contaminação e que o maior risco pode estar nas frações defeituosas, como amêndoas e cascas deterioradas (Vargas *et al.*, 2013). Ainda assim o método de classificação manual também tem comprovadamente capacidade de redução de micotoxinas (Pacheco e Martins, 2013). Além das técnicas industriais, o próprio consumidor pode identificar visualmente castanhas com AFL por estarem aparentemente contaminadas e excluí-las, reduzindo assim a probabilidade de consumo do alimento contaminado (Marklinder *et al.*, 2004). Ilustrações de fungos contaminantes em castanha estão na figura 1.

De um modo geral os principais gêneros relacionados com a produção de micotoxinas são *Aspergillus* e *Penicillium*. Segundo Taniwaki *et al.* (2018) os seguintes fungos estão associados à castanha-do-Brasil: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamari*. Nem todos os fungos associados às nozes são produtores de micotoxinas, por outro lado, a associação de diversas espécies com frutos secos e sementes, por exemplo, é frequentemente relatada. A espécie *Aspergillus* é uma das mais importantes na deterioração dos alimentos e na produção de micotoxinas e adaptada ao crescimento nos trópicos, uma vez que

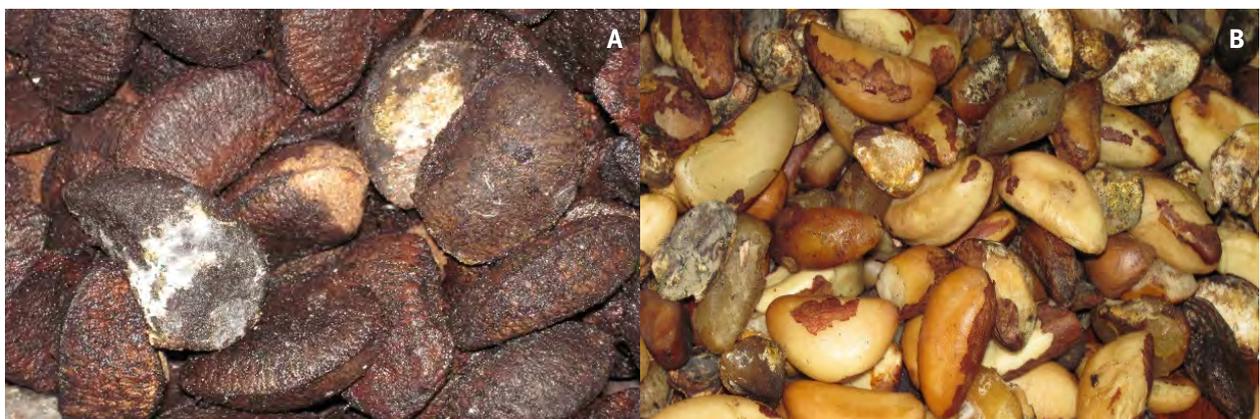


Figura 1. Castanha-do-Brasil visualmente deterioradas por fungos. A) Castanha-do-Brasil com casca. B) Castanha-do-Brasil sem casca.

espécies comuns raramente crescem <10°C e a maioria cresce fortemente a 37 °C ou acima. Além das etapas de desidratação para prevenir a contaminação fúngica, programas de segurança como o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e certificações foram adotados em algumas usinas completam a aplicação de exigências que previnem a contaminação. Nesse contexto o monitoramento e controle das variáveis que afetam o crescimento fúngico e produção de toxinas são fundamentais. Deve ser mantido o teor de umidade <15% segundo a legislação brasileira (Brasil, 2010) e A_w <0,70 (CAC, 2010). Quanto aos níveis de contaminação, a tabela 2 apresenta os relatos de diversos autores, sendo possível perceber que diversas amostras já beneficiadas não atendem aos limites máximos de AFL de 10ug/kg para castanha para consumo direto e 15ug/kg para castanhas para posterior processamento, conforme a legislação brasileira (Brasil, 2011).

3. Farinha de Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta importância socioeconômica mundial e de acordo com a Food and Agriculture Organization of the United States (FAO) a mandioca é considerada o terceiro alimento energético mais importante nos trópicos, após o arroz e milho. Em função da importância histórica, a mandioca é cultivada extensivamente em todos os estados brasileiros, em consequência das condições favoráveis ao seu crescimento, e também pela sua facilidade de cultivo, adaptabilidade a diversos tipos de solo e relativa resistência a períodos de estiagem (Almeida e Santos, 2011). Na região Norte, a cultura é tradicionalmente executada por pequenos produtores rurais, que utilizam na maioria das vezes a mão de obra familiar, sendo de grande importância para a geração de renda, e em alguns casos é a única fonte econômica. Rodrigues *et al.* (2015) avaliaram amostras de farinhas de mandioca ($n=24$) comercializadas a granel em feiras livres do município de Ji-Paraná (RO) e inoculadas por plaqueamento superficial em placas contendo Potato Dextrose Agar acidificado com ácido tartárico 10%. Os autores observaram que 75% das amostras apresentaram contaminação por bolores sendo que dessas 8,3% apresentaram contaminação superior ao padrão estabelecido por outros autores, não houve crescimento de leveduras possivelmente pela baixa A_w da farinha de mandioca. Gomes *et al.* (2014) avaliaram três tipos de farinha (farinha branca, d'água e Uarini) adquiridas em mercado de Manaus-Am que revelaram ser um substrato para fungos filamentosos e unicelulares. A farinha do uarini foi o tipo que apresentou maior índice de contaminação. Das amostras coletadas (todos os tipos de farinha) foi encontrada contaminação por fungos do gênero *Penicillium* (40%) e por *Aspergillus* (38%). Em estudos realizados com farinha de mandioca foram encontrados relatos de maior frequência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos potencialmente toxigênicos (Kraemer, 1998; Lemos, 2001). Mundim *et al.* (2014) analisaram o teor de cianeto residual presente em farinhas de mandioca e a influência sobre o crescimento de fungos micotoxigênicos (*Aspergillus* e *Penicillium*). Assim, foram estabelecidas as concentrações de cianeto em amostras ($n=30$) de três tipos de farinhas, *Seca*, *D'água* e *Mista* ($n=30$) apresentadas na figura 2. A semeadura dos fungos foi feita meio Saboraud sólido com poço central (capacidade de 500 μ L) onde foram aplicadas

Tabela 2. Aflatoxina em castanha-do-Brasil beneficiada e/ou pronta pro consumo avaliadas por diferentes autores.

Origem	N	Quantidade de amostra (g)	Teor de Aflatoxina ^a	Método	Autores
Brasil					
Acre	03	3000	0,86 ^b	CLAE ^c	Alvares <i>et al.</i> (2012)
Amazonas	20	1000	2,0-9,0 ^d	LC-MS-MS ^e	Pacheco e Martins (2013)
Ceará	08	NI	12,5 ^b	CCD ^f	Moreira <i>et al.</i> (2014)
Distrito Federal	67	1000	36,9(<4-1.972)	CCD	Andrade <i>et al.</i> (2012)
São Paulo	17	1000	0,26 (<ND ^g -0,98)		
Amazonas	22	1000	<LD ^h	CLAE	Iamanaka <i>et al.</i> (2014)
Pará	12	1000	(<ND-140,00)		
Portugal					
Porto	02	50-200	N.D.	LC/MS-MS	Cunha <i>et al.</i> (2016)

^a Expresso em μ g/kg; ^b média (faixa); ^c Cromatografia líquida de alta eficiência; ^d Faixa (mínimo e máximo); ^e Cromatografia líquida massa-massa; ^f Cromatografia em camada delgada; ^g não detectado; ^h Limite de detecção de 0,05 μ g/kg.

as concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg CN/kg e o grupo controle com solução água destilada (0 mg CN/kg). As placas foram condicionadas a 25°C durante 24, 48 e 120 horas. Houve observação direta do crescimento fúngico e os resultados mostraram que os fungos cresceram de forma desigual de acordo com a concentração aplicada. O desenvolvimento inicial em todas as concentrações, em ambos os gêneros, foi pela borda das placas, no entanto, em ritmo mais lento nas maiores doses. Após 120 horas apenas a concentração de 20 mg/kg não apresentou crescimento próximo à circunferência central. Desta forma, os resultados mostraram que o cianeto retardou o crescimento de fungos dos gêneros avaliados, com efeito dose dependente, entretanto, apenas durante um período curto, indicando que possível inibição destes tipos de fungos ocorre logo após o preparo das farinhas e consequentemente inviabilizando a produção de micotoxinas neste período, assim as condições de armazenamento continuam sendo a principal forma de garantia de qualidade do produto.

Em outro trabalho Mundim *et al.* (2019) os autores citaram a ocorrência de micotoxinas em amostras de farinha de mandioca ($n=30$) produzidas em Coari-AM-Brasil e foram encontradas as seguintes micotoxinas em percentuais nas amostras: citrinina=90%, Patulina=86,6%, AFB1=86,6, AFB2=96,6, AFG1=90% e AFG2=93,3.

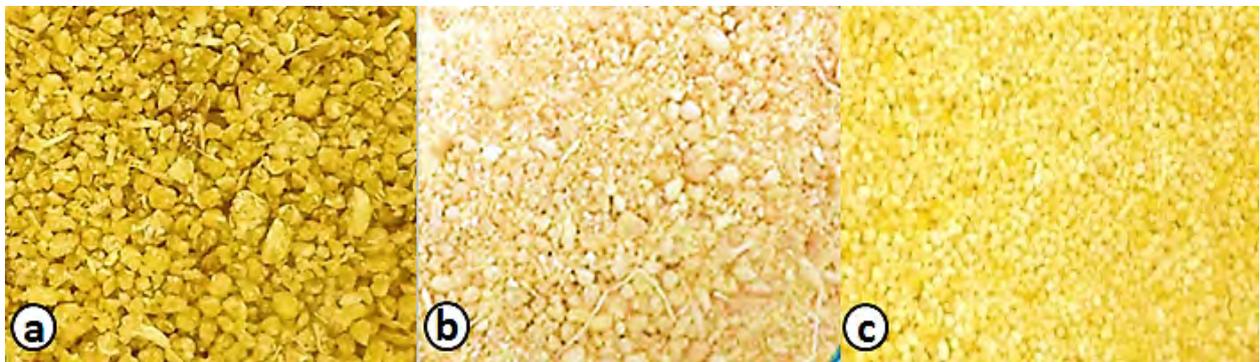


Figura 2. Farinhas de mandioca. A) D'água; B) Mista e C) Seca.

4. Farinha de Peixe e Rações

Os primeiros relatos de mortandade em animais alimentados com ração contaminada por fungos na região Amazônica são de Sá e Castrillon (1974). No episódio, espécies fúngicas dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, foram obtidas a partir das aves necropsiadas e das rações administradas, em que foram a óbito 22,06% das aves de uma granja situada em Manaus-Am. Segundo Atayde *et al.* (2014) as espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são fungos toxigênicos e frequentes contaminantes de insumos e ração animal. Os peixes na piscicultura intensiva dependem totalmente da alimentação fornecida pelo homem para crescimento e sobrevivência, sendo uma melhor qualidade dessas rações dependente do controle sanitário dos insumos utilizados na fabricação, os quais são suscetíveis ao ataque de fungos, inclusive os micotoxigênicos.

A percepção da problemática sobre fungos e micotoxinas em peixes iniciou-se no início dos anos 1960, quase concomitante à associação desses microrganismos e respectivos metabólitos à doença X dos perus. No Estado do Amazonas verificou-se a toxicidade de fungos isolados de rações extrusadas produzidas por fábricas locais e destinadas à piscicultura. Para os ensaios de toxicidade, foram utilizados náuplios estágio 1 de *Artemia salina*. Constatou-se grave atividade biológica dos biocompostos produzidos pela maioria das espécies isoladas, indicando preocupação devido os riscos à produtividade, à saúde animal e aos consumidores desses animais cultivados (Atayde *et al.*, 2008).

Além da ração, a farinha de peixe conhecida na região Amazônica como piracuí, foi avaliada por Kluczkovski e Kluczkovski (2012) e está ilustrada na figura 3.

Os autores detectaram a presença de contaminação por AFL e a tabela 02 traz os resultados das amostras ($n=30$) avaliadas com a media de: (a) *Aw*: 0,65 (0,64-0,70); (b) *mc*: 15,5 (10,0-20,8) % e (c) Total AFLs: 10,5 (1,5-18,0) µg/kg. Das amostras, 20% foram positivas para AFL sob o Limite de Quantificação do método

(LOQ). Todas as amostras positivas estavam abaixo do limite do regulamento brasileiro para alimentação animal de 50 µg/kg. As 5 (cinco) amostras positivas para AFL pertencem ao grupo de amostras com *A. flavus* isolado no teste de fungos e identificadas como produtoras de AFL. Este fato confirma a associação entre a presença de linhagens aflatoxigênicas e a produção de AFL em amostras de farinha de peixe.



Figura 3. Farinha de peixe (piracuí). Kluczkovski e Kluczkovski Junior (2012).

Tabela 2. Teores de atividade de água (Aw), umidade e AFL total em amostras de farinha de peixe comercializada no Amazonas

No	Aw	Umidade %	AFL µg/kga	
			Positivas (%)	Média
30	0,65 (0,64-0,70)	15,5 (10,0-20,8)	5 (20)	10,5 (1,5-18,0)

Fonte: Kluczkovski e Kluczkovski Junior (2013).

^a aflatoxina total (B1+B2+G1+G2)

5. Conclusões

Apesar das condições ambientais da Amazônia afetarem os fungos toxigênicos, as ações pré e pós colheita podem atuar continuamente na prevenção da produção de toxinas. Técnicas de secagem ainda na coleta e transporte devem ser aplicadas de forma a fomentar a manutenção das atividades, especialmente as extrativistas.

As tecnologias de detoxicação precisam alinhar as possibilidades de suprimento energético e limitações de logística da região amazônica com os investimentos necessários para aquisição de equipamentos e implantação de alguns métodos de conservação que sejam viáveis tanto para a indústria quanto para o coletor de castanha na Floresta.

Os dados de ocorrências de micotoxinas necessitam ser acompanhados dos estudos de análise de risco e impacto que o consumo desses alimentos tem na saúde do consumidor. Assim como é necessária uma maior interação com os órgãos de vigilância sanitária de forma que os dados obtidos na academia consigam de fato auxiliar na definição de políticas públicas na proteção da saúde da população com relação ao armazenamento e consumo de alimentos.

6. Referências

- Almeida, M.A., Santos, E.S. 2011. Análise comportamental do agronegócio da mandioca (*Manihot esculenta*) no Brasil de 2004 a 2009. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, 5:441-49.
- Álvares V.S., Castro I.M., Costa D.A., Lima A.C., Madruga A.L.S. 2012. Quality of Brazil nuts marketed in Rio Branco, Acre. *Acta Amazonica*, 42(2): 269-274.
- Andrade P.D., Mello M.H, França J.A., Caldas E.D. 2013. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(1): 127-136.

- Arrus K., Blank G., Abramson D., Clearc R., Holley R.A. 2005. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, 41: 513-527.
- Assunção E., Reis T.A., Baquião A.C., Corrêa B. 2015. Effects of Gamma and Electron Beam Radiation on Brazil Nuts Artificially Inoculated with *Aspergillus flavus*. *J Food Prot.*, 78: 1397-401.
- Atayde, H.M., Oliveira, I.M.A., Inhamuns, A.J., Teixeira F.S. 2014. Fungos toxigênicos e micotoxinas na alimentação de peixes: uma revisão. *Scientia Amazonia*, 3:59-71.
- Bando E., Goncalves L.N., Tamura N.K., Machinski Junior M. 2007. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. *J. Bras. de Pat. e Med. Laboratorial*, 43(3): 175-180.
- Bensabath, G. e Soares, M. do C. P. 2004. A evolução do conhecimento sobre as hepatites virais na região amazônica: da epidemiologia e etiologia à prevenção. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 37:14-26
- Brasil. 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>> Acesso em: 7 março. 2017.
- Brasil 2010. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Instruction Normativ nº 11, 22 march 2010. Criteria and Procedures for the control hygiene and health the Brazil nut and its by products. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 mar. 2010.
- Brasil 2008. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal - pncrc/vegetal. (Instrução Normativa SDA/MAPA nº 42, de 31 de dezembro de 2008).
- CAC - Codex Alimentarius Commission. 2010. Proposed draft maximum level for total aflatoxins in Brazil nuts. *ALINORM 10/33/41 Appendix V*, p.47. Joint FAO/WHO Food Standards Program, FAO, Rome.
- Caldas E.D. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. 2002. *Revista de Saúde Pública*, 36(3): 319-323.
- Coslovsky, S. 2014. Economic Development without Pre-Requisites: How Bolivian Producers Met Strict Food Safety Standards and Dominated the Global Brazil-Nut Market. *World Development*, 54:32-45.
- Costa D.A., Álvares V.S., Kusdra J.F., Nogueira, R.M., Maciel V.T., Miqueloni D.P. 2017. Quality of in-shell Brazil nuts after drying using a pilot natural convection oven in the state of Acre, Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20:2015104.
- De Mello, F., Scussel V.M. 2009. Development of Physical and Optical Methods for In-shell Brazil Nuts Sorting and Aflatoxin Reduction. *Journal of agricultural Science*, 1:3-14.
- Giordano, B., Scussel, V.M., Simao, V., Manfio D., Galvao S., Rodrigues M.N.F. 2011. Effect of Oxygen-Reducing Atmospheres on the Safety of packaged Shelled Brazil Nuts during Storage. *International Journal of Analytical Chemistry*, ID 813591.
- Gomes, L.P., Silva, L.J.G., Fernandes, G.S.T., 2007. Identificação dos principais gêneros fúngicos nas farinhas de mandioca comercializadas nos principais mercados de Manaus. *Revista Igapó*, 1:60-64.
- Iamanaka BT, Nakano F, Lemes DP, Ferranti LS, Taniwaki MH: Aflatoxin evaluation in ready-to-eat brazil nuts using reversed-phase liquid chromatography and post-column derivatisation. *Food Add & Cont: Part A*, 2013, 31:917-923.
- Jager, A.V., Tedesco, M.P., Souto P.C.M., Oliveira C.A.F. 2013. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33:87-92.
- Jardim A.N.O, Caldas E. 2009. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 32:1898-1909.
- Kraemer, F.B., Stussi, J.S.P. 1998. Avaliação Micológica de farinha de mandioca (*Manihot utilissima*): Incidência de *Aspergillus* e *Penicillium* com potencial micotoxigênico. *Rev. Higiene Alimentar*, 12:38-40.
- Kluczkovski, A., Barroncas, J., Kluczkovski Junior, A., Felix P., Xavier, L., Viana, C., Lima, E. 2019. Aflatoxin in cheese samples from the Amazon region. *African J. of Pharmacy. In press*.
- Kluczkovski A.M., Martins M., Mundim S.M., Simões R.H., Nascimento K.S., Marinho H.A., Kluczkovski-Junior A. 2015. Properties of Brazil nuts: A review. *African Journal of Biotechnology*, 14:642-648.

- Kluczkovski A. e Kluczkovski-Junior, A. 2013. Aflatoxin in Fish Flour from the Amazon Region. Chapter 9. Intechopen.
- Lemos, J.A., Costa, M., Lemos, A.A., Silva, M.R.R. 2001. Isolamento e identificação de fungos em farinhas de milho e mandioca em Goiania-GO. *Rev. Higiene Alimentar*, 30:31-36.
- Lima A.M., Gonçalves E.C., Andrade S.S., Barbosa M.S.R., Barroso K.F.P., de Sousa M.B., Borges L., Vieira J.L.F., Teixeira F.M. 2013. Critical points of Brazil nuts: a beginning for food safety, quality control and Amazon sustainability. *J Sci Food Agric*, 93: 735–740.
- Lorini, A., Wobeto, C., Rosa, C.C.B., Hatem, T.A., Botelho, S.C.C. 2018. Influence of packaging on the quality of Brazil nuts. *Acta Amazonica*, 48(4): 368-372
- Marklinder I, Linblad M, Gidlund A, Olsen M: Consumers' ability to discriminate aflatoxin contaminated Brazil nuts. *Food Addit Contam.*, 2005, 22:56-64.
- Martins M., Kluczkovski, A.M., dos Santos A.C.S., Fernandes O.C.C., Scussel V.M. 2014. Evaluation of ochratoxin A and fungi in powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth), a caffeine rich product from Amazon forest. *African Journal of Microbiology Research* 8:545-550.
- Moreira, M.F., Oliveira, T.R., Vieira, I.G.P., Freire, F.C.O., Silva, S.C., Ribeiro, L.M. 2016. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 75:1698.
- Mundim, S., Kluczkovski A.M., Rodrigues, J.C., Souza, V.C., Fernandes O. C. 2019. Toxigenic fungi and mycotoxins in cassava flour produced in the Amazon Region. *Brazilian Microbiology*. *In press*.
- Pacheco A.M, Martins M. 2013. Brazil nut sorting for aflatoxin prevention: a comparison between automatic and manual shelling methods. *Food Science and Technology*, 33(2):369-375.
- Rodrigues E.B, Araújo A.M., Sobral F.O.S., Romão, N.F. 2015. Mold presence of assessment and yeast in cassavas flour (*Manihot esculenta* Cratz) marketed in bulk in free trade shows the municipality of Ji-Paraná-RO. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, 2:15-22.
- Silva, A.J.R., Rodrigues A.J., Botelho, S. C. C., Hoogerheide, E. S. S., Tonini, H., Baldoni, A. B., Botelho, F. M. 2018. The importance of good practices in the management and collection of Brazil nuts for collectors in Itaúba. *Cadernos de Agroecologia*, 13:1.
- Sá, L.A.G.F., Castrilon, A. 1974. Mortandade de aves alimentadas com ração contaminadas por fungos. *Acta Amazonica*, 4: 49:52.
- Taniwaki, M., Pitt J., Megan, N. 2018 *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23:38–43.
- Vargas E.A., Santos E.A., Whitaker T.B., Slate A.B. 2011. Determination of aflatoxin risk components for in-shell Brazil nuts. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28: 1242-1260.

Chilean pepper: Spoilage fungi and mycotoxins contamination risk in *Capsicum* products

COSTA, Jéssica¹; LIMA, Nelson²; SANTOS, Cledir^{1*}

¹ Universidad de La Frontera, Temuco 4811-230, Chile

² CEB-Centre of Biological Engineering, Micoteca da Universidade do Minho (MUM), University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

Email: cledir.santos@ufrontera.cl

Abstract

Capsicum products, such as chilli powder, paprika, sauces, and spice mix, have highly been consumed worldwide. In Chile, berry fruits of *Capsicum annuum* L. cv. “Cacho de Cabra” are used for the manufacture of a traditional pepper powder known as Merkén. Two alert notifications regarding the presence of Ochratoxin A in Merkén have been reported by the Chilean Ministry of Health. These alerts have triggered concern mainly due to the food safety of *Capsicum* derivative products and the health risks to which the Chilean population consumers of Merkén may be subjected. In this context, the main aim of this work was to review the critical points of mycotoxin contamination in the *Capsicum* production chain used for Merkén manufacture in Chile; outlining the possible causal agents of mycotoxin contamination in Merkén production chain. Current national and international legislation on mycotoxin contamination in pepper and its derivative are here discussed. Moreover, preventive and corrective measures adopted by the Chilean regulators’ agencies to control mycotoxin in this spice are also discussed.

Key words: Mycotoxins, Ochratoxin A, Pepper, Spoilage fungi

1. Introduction

Capsicum pepper is the second largest consumed spice throughout the world, after black pepper. Its exotic characteristics of taste, aroma, colour and pungency, as well as the multivariate forms of consumption, have made this spice widely used in gastronomy.

As with any other crops, *Capsicum* pepper is also susceptible to fungal infection and mycotoxin contamination. The control of water activity (a_w), temperature and moisture content are essential to avoid the growth of potential mycotoxigenic spoilage fungi, such as *Aspergillus* and *Penicillium* species (Mandel, 2005; Ruiz-Moyano *et al.*, 2009).

Concerning classes of mycotoxins, aflatoxins (AFs) and ochratoxina A (OTA) are among the most important contaminants from a consumer point of view. In addition, citrinin (CIT), deoxynivalenol (DON), patulin (PAT), sterigmatocystin (ST) and zearalenone (ZEN) have also been detected in *Capsicum* products (Santos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011; Jeswal and Kumar, 2015).

In Chile, pepper powder consumption per capita reaches 5 g/day/person (Universidad de Chile, 2011). The variety of *Capsicum annuum* L. cv. “Cacho de Cabra”, one of the most consumed in the country is traditionally produced by Amerindian Mapuche Ethnicity. The Mapuche culture and their gastronomic influence is of great importance for the identity of Chile as a country (FIA, 2010).

The production of this commodity on an industrial scale, associated with the widespread acceptance of this product in the Chilean market, has made *Capsicum*-based products economically relevant for agribusiness. However, there is still a lack of information, especially on mycobiota and possible mycotoxins in *Capsicum* pepper.

This chapter aims to discuss the food safety of peppers in Chile, highlighting the impact of spoilage fungi and mycotoxin contamination on human health and agribusiness. Current national and international legislation on

mycotoxin contamination in pepper and its derivative will be discussed. Moreover, preventive and corrective measures adopted by the Chilean regulators' agencies to control mycotoxin in this spice will also be discussed.

2. *Capsicum annuum* L. cv. "Cacho de Cabra": Cultural importance to Chile

Merkén is a product intrinsically associated to the ancestral Mapuche Ethnicity. Mapuche is an Amerindian Ethnicity with its communities mainly living in south-central Chile and some communities living in south-western Argentina. According to the data reported by the National Institute of Statistics of Chile, in 2016 about 1.5 million of its habitants (c.a. 8% of the whole Chilean population) identified themselves as members of the Mapuche Ethnicity (INESTAT, 2016). Although the Mapuche Communities are disappearing at an accelerated rate, their cultural and gastronomic influence is of great importance for the identity of Chile as a country.

Moreover, the Mapuche's Culture has been hegemonised through the centuries, losing part of their tradition and cultural habits. To recover their Cultural Intangible Heritage, the Mapuche Communities have often claimed the loss of their Culture, which is under risk.

Merkén is produced by families of the Mapuche Ethnicity in the central-south region of Chile, mainly in the Region of La Araucanía and is commercialised on the national and international market (FIA, 2010). The production of Merkén by these families has been carried out mainly in an artisan form.

3. *Capsicum* peppers in Chile

Red peppers are among the most popularly consumed spices around the world. In the American continent, *Capsicum* is described as one of the oldest cultivated plants, regarded as a prehistoric crop (Govindarajan and Salzer, 1985).

Capsicum is a horticultural crop produced worldwide, includes more than 30 species, from which *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. chinense* and *C. pubescens* are the most common ones. These species encompass cultivars producing a wide variety of shapes and sizes of peppers, both pungent and non-pungent, ranging among bell peppers, jalapenos and cayenne peppers. Plants are bushy, about 60-80 cm height and semi-perennials, that are grown as annuals in cultivation; usually produced in tropical and sub-tropical areas (Govindarajan and Salzer, 1985; Mueller *et al.*, 2005).

In Chile, the main species of cultivated pepper is *C. annuum*, which are popularly known as "aji". In addition, in other countries, it is also commonly known as "chilli", "red pepper", "pepper", "hot red pepper", "tabasco", "paprika", and "cayenne" (Suzuki and Iwai, 1984; Cichewicz and Thorpe, 1996).

Chilean varieties of *C. annuum* include pungent and non-pungent peppers. The spiciness differences in pepper are due to capsaicinoids presence, a secondary metabolite group that is exclusively produced in their fruits and present throughout its development and maturity (Figure 1).

Sweet peppers varieties (*e.g.*, Hungarian sweet wax), although less common are used for the preparation of pickles and paprika. Pungent varieties (*e.g.*, Crystal, Cacho de Cabra, Cayenne S Largo, Anaheim and Chilean) are the most cultivated and consumed due to their aroma and spiciness (FIA, 2006).

Capsicum annuum L. cv. "Chilean" is the variety with the largest cultivated area. Berry fruits of this variety are used in agribusiness for the preparation of sauces, pasta, and dehydrated products. Cristal variety is intended for fresh consumption and pickles (FIA, 2006).

C. annuum L. cv. "Cacho de Cabra" variety are a key element for the creation of Merkén, which is a condiment widely used in Chilean gastronomy. Besides its economic importance, this variety is the one with the most cultural impact, as it is traditionally produced by native Chilean Communities (FIA, 2006).

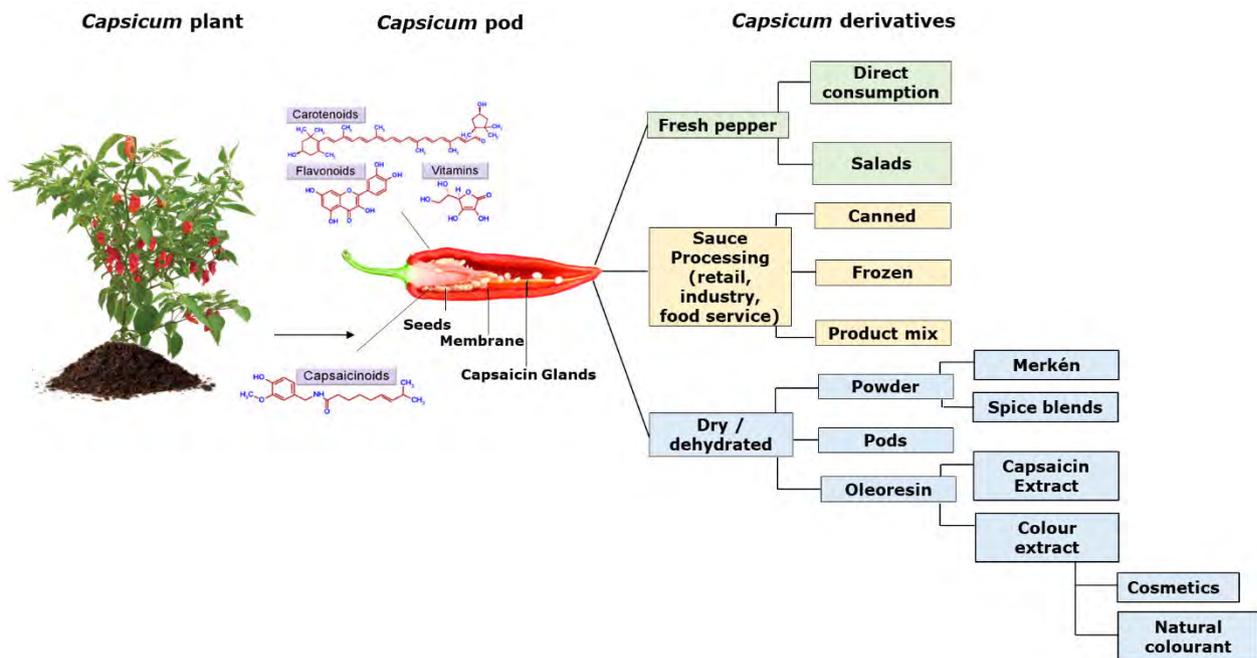


Figure 1. *Capsicum annum* processing chain, highlighting the composition and *Capsicum* derivative products. Adpated: ODEPA, 2013.

3.1. *Capsicum* production

Red pepper is the second largest consumed spice throughout the world, after black pepper. According to the Food and Agriculture Organisation (FAO), in 2016, the worldwide production area for dried *Capsicum* was 1.798.847 ha, with a production of 3.918.159 tonnes of harvested product per year (FAOSTAT, 2018). China is an important supplier of crushed and ground peppers. In 2016, China produced the highest amount of peppers, followed by Mexico and Turkey.

In Chile, data available for production, importation and exportation are general and consider the entire *Capsicum* genus in different forms (e.g., fresh, dried, ground or powdered). *Capsicum* cultivation extends from Region of Arica to Araucanía Region (northern to central-south, respectively), covering approximately 522 hectares of the planted area. The Chilean Regions of Coquimbo and Maule are the main producers of sweet pepper, with 131.4 and 213.6 hectares, respectively, dedicated to this crop (FIA, 2006).

Capsicum annum L. cv. “Chilean” is the most produced pepper at national level, corresponding to 88% of the cultivated surface. While *C. annum* L. cv. “Cacho de Cabra” is the second most-produced variety, corresponding to 9% of the cultivated surface in Chilean territory. The susceptibility of this variety to spoilage fungi is pointed to as one of the factors that can reduce production yields (FIA, 2006).

C. annum L. cv. “Cacho de Cabra” is mainly produced in the Chilean Region of La Araucanía by small local producers. In addition, Chilean Production Development Corporation (CORFO) financed ventures such as *Chilean gourmet* e *Chili from Chile* to promotes the production and export of Merkén (e.g., *C. annum* spice). Merkén is also sold on an industrial scale by Marcopolo, Gourmet, Sabu, and Surco, which are the leading brands in the Chilean market.

Peppers are amongst the spices that are most susceptible to fungal contamination, especially by potentially mycotoxigenic species. Several authors have highlighted the need for managed carefully throughout pepper production as a strategy to prevent fungal infection.

3.2. Process Production of *C. annuum* L. cv. “Cacho de Cabra”

Capsicum annuum L. cv. “Cacho de Cabra” corresponds to a local ecotype of the Region of Araucanía, mainly destined for Mekkén production. Production can be done on an artisanal and industrial scale (FIA, 2010).

The production of *C. annuum* L. cv. “Cacho de Cabra” begins with the selection of seeds from previous harvests. Selected seeds are sown in a nursery from May to June (end of autumn to early winter in the Southern Hemisphere). The selection criteria for pepper seeds must be rigorous as this step will be crucial for good production outcome.

Unlike the industrial process, artisanal production has no strict criteria for seed selection and disinfection. The seeds of the cultivar “Cacho de Cabra” are saved from the previous harvest to make new sowing.

Then, from August to September (end of winter to early spring), plants are transplanted to the field for plant growth and berry fruit production. Then, from March to April (beginning of autumn), berry fruits are harvested. Harvesting of *Capsicum* fruits takes place at different stages during maturation. For the agro-industry sector, they are usually harvested fully mature (FIA, 2010).

At this stage of advanced maturity, the pod is susceptible to mechanical damage and the action of phytophagous insects, sometimes vectors of fungal spores. The advanced maturity of the pods, open wounds and rot are considered serious damages for the elaboration of Mekkén, once it can diminish the quality of the product.

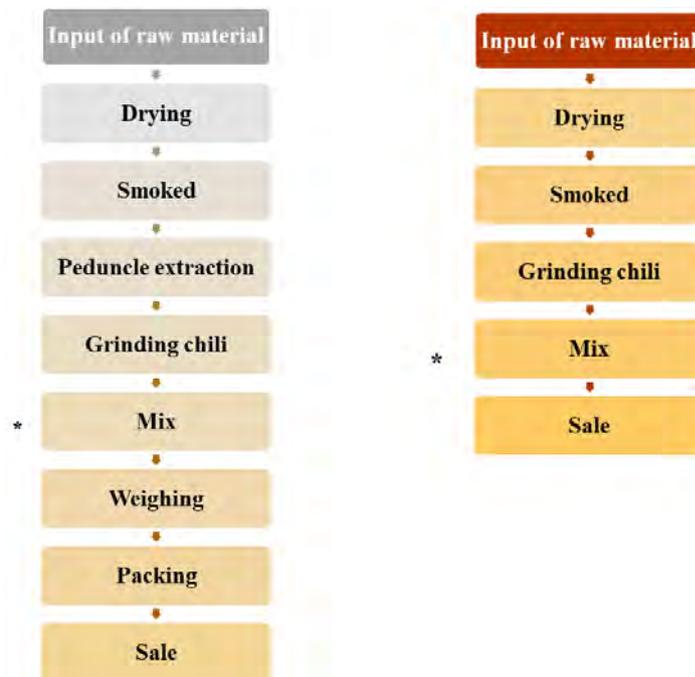


Figure 2. Semi-industrial and artisanal production chain of *C. annuum* for Mekkén production.

*Adding salt and toasted coriander Adapted: FIA, 2010.

After harvested, it is recommended that red pepper moisture content ($65\text{--}80\% = 0.995 a_w$) should be immediately reduced to around $13\% (=0.50 a_w)$ by drying to inhibiting enzyme activities, fungal growth, and mycotoxin contamination (Toontom *et al.*, 2012; Sanzani *et al.*, 2016).

Berry fruits are usually dried by direct sun exposure or mechanical heat. Traditionally, peppers are dried drying by sun exposure or inside “Rucas”, that are typical Mapuche’s houses made of wood and straw. After peppers being placed on the floor and turned several times to obtain an even drying. Artisanal drying of pepper can take between 5 and 15 days, depending on the hours of sun and weather conditions (FIA, 2010).

Mechanical dehydration is used at an industrial scale; the temperature, air velocity and humidity-controlled conditions reduces the time for microbial contamination and improves pepper quality. The high costs of investing in equipment, maintenance, and energy costs make this approach inaccessible to small producers (Kaleemullah and Kailappan, 2005).

Capsicum annuum can be sold whole fresh, crushed, and mixed with other spices, expanding business possibilities for Chilean traders (Figure 2). After drying, the farmers smoke the fruits, for a period close to half an hour on a native wood fire. This process gives it a darker colour and a certain smoky flavour that, once transformed, generates a chili pepper known as Merkéñ. Moreover, after grinding *C. annuum* L. cv. “Cacho de Cabra” some communities add other spices to obtain the final Merkéñ with the producer characteristic.

The final Merkéñ has about 70% of pepper (with or without pepper seeds, depending on each producer), 20% of coriander seeds and other spices, and 10% sea salt. Overall, these added spices give to the Merkéñ a darker colour, while the smoke process gives it a smoky flavour (FIA, 2010).

4. Marken: Internal Trade and Current Risks

Due to its high demand, nowadays Merkéñ is also processed industrially by Chilean Industries and sold on the national and international market mainly by the following brands: Marcopolo, Gourmet, Sabu and Surco. These 4 brands share about 90% of the national production and national and international markets. In addition, the Chilean startup called Chili, funded by the Corporation for the Promotion of Production (CORFO, Chile), received financial support for the production of traditional and gourmet Merkéñ.

The industrialisation of the Merkéñ production aims to promote its standardisation and obtain a commercial product of higher quality and local identity (FIA, 2010). In the year 2015, the total Chilean exportations of Merkéñ reached 4.4 million US dollars, an increase of 11.3% compared to 2014 (ProChile, 2016). In that same year, Chile produced 58% of the Merkéñ imported by Argentina. The production of dehydrated chili and by-products such as Merkéñ, paprika, sauces, spice mix is a sector of high economic potential.

However, in recent years, the decline in domestic production, low yields in the last seasons, and high energy costs associated with processing have resulted in a low export index of processed chili products. To try to reverse the situation, Chile has sought to improve its competitiveness and regain its participation in the international market, especially in Europe and the United States of America, where there is a great demand for this agrifood product (ACHIPIA, 2018).

Among the strategic measures adopted by Chile, search for the development of more productive *Capsicum* varieties, tolerant to both frosting and phytopathogens. In addition to high productivity and sensory properties, in demanding markets, it is essential to ensure the food safety of the marketed product.

In 2017, the Chilean Ministry of Health reported two cases of Merkéñ contamination with mycotoxin, mainly with OTA (Minesal, 2017). It put the market of this commodity under risk (ACHIPIA, 2018), which has directly affected Mapuche communities' revenues. Such communities have in this spice an important source of income for their families' subsistence.

In addition, agribusiness sector also suffers economic losses, with the blockade of its products and mainly the credibility lost in the international market. Similarly, the Pakistani pepper agroindustry despite the excellent sensorial characteristics of its pepper, suffered economic regression. The high levels of mycotoxins detected in their products have diminished their business relations. Peppers and by-products are prone to fungi contamination, including mycotoxigenic species (Iqbal *et al.*, 2010; Iqbal *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2013).

5. Mycobiota and Mycotoxin in Chilean *Capsicum*

Mycotoxins are low molecular weight metabolites produced by fungi that can confer risks to human and animal health. Peppers and industrialised derivatives have been reported to be frequently contaminated with aflatoxins (AFs), OTA, fumonisins (FBs), zearalenone (ZON), trichothecenes (TCTs), and patulin (PAT). Among

these, OTA has been one of the major fungal toxins found in pepper samples (Yogendrarajah *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2016; Khazaeli *et al.*, 2017; Gambacorta *et al.*, 2018).

Ochratoxins are a group of fungal secondary metabolites whose structure derives from a dihydromethyl-isocoumarin linked to phenylalanine using a peptide-like bond. OTA is the most abundant and the most toxic of the ochratoxins' group, which also includes ochratoxins B (OTB) and C (OTC), and other derivatives (Almela *et al.*, 2007). OTA is a nephrotoxic, cytotoxic, carcinogenic, teratogenic, and immunosuppressive compound. It may also induce gene mutation, although the mechanism of genotoxicity is not clear yet. Moreover, some individual human exposure to OTA has been related to Balkan Endemic Nephropathy (BEN) syndrome (Creppy *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 1999; Abouzied *et al.*, 2002; Blank *et al.*, 2003).

The warm and humid climate in the production areas, poor hygienic conditions during production, transport, packaging and storage may increase the risk of fungal proliferation and OTA contamination in peppers (Mandeel, 2005; Paterson and Lima, 2011; Taniwaki *et al.*, 2018). In recent years some authors have referred to the impact of climate changing on the increasing of mycotoxin production by food mycotoxigenic fungi (Paterson and Lima, 2010; Battilani *et al.*, 2016; Leggieri *et al.*, 2017).

According to the OECD, the Chilean agriculture production has been dealing with warmer temperatures and extreme events that are likely to be more frequent and severe (OECD/ECLAC 2016). In this context, climate changing appear as a main concerning for production of food safety, regarding mycotoxin contamination in Chile.

In the field, proper fertilizer use and proper irrigation are key to decreasing soil-born fungi (*e.g.*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Harzia* and *Rhizopus*). In addition, the implementation of good agricultural practices is important to prevent the proliferation of field pathogens as *Alternaria* and *Fusarium*. Species of both genera can cause rot and wilt in living plants and can infect fresh fruits, especially after injury by insects or chilling, mechanical damage (Hochmuth and Hochmuth, 2010; Yang *et al.*, 2011).

The drying stage of the pods is characterised by long periods of exposure to the sun (*e.g.*, between 5-15 days), where pods can be affected by changes in temperature, exposure to dust, wind and insect infestation. This time-frame allows fungal colonisation to occur, especially by xerophilic/xerotolerant fungi (*Aspergillus* and *Penicillium* species). In addition, poor post-harvest hygiene in storehouses can lead to further fungal colonisation and an increase in the risk of mycotoxins contamination (Santos *et al.*, 2008).

In the industrial sector, the drying stage is automated, despite the high energy costs, the controlled conditions of temperature, air velocity and humidity reduce the microbial contamination and improve chili quality. However, OTA is very stable and can remain in the substrate even after the grinding and baking process. It is noteworthy that, quality of Mekén is directly related to quality pods collected in the field (Costa *et al.*, 2019a).

OTA is mainly produced by some species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Aspergillus ochraceus*, species belonging to *Aspergillus* section *Nigri* (especially *A. carbonarius*, but in less extension (10%) by *A. niger* too) and *Penicillium verrucosum*, have been found as important OTA producers. Within these, *A. carbonarius* have been identified as the key species responsible for OTA contamination in agri-food products. They contaminate different crops with different distribution depending on climate conditions. *Aspergillus* species predominate in warm and temperate regions while *Penicillium* species are frequent in colder regions. OTA production is higher at 0.98 a_w, regardless of the temperature level, but its production tends to rise at the optimum temperature, between 25 and 30 °C in *A. ochraceus* (EFSA, 2006; Wang *et al.*, 2016).

A few years ago, *A. ochraceus* was considered to be the main source for OTA production in relatively warmer regions, while *P. verrucosum* being in colder ones. However, *A. westerdijkiae*, a potential OTA producing fungus that is phylogenetically similar to *A. ochraceus*, is frequently found in tropical regions, and although it does not grow at 37 °C, it is still considered to be one of the important OTA producers (Almela *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016). Mycotoxin production depends on each fungal strain (Rodrigues *et al.*, 2011). Those fungal species not considered OTA producer become included in the "OTA producer list" if there is found the genetic requirement for OTA biosynthesis in one of their strain. In addition, a fungal species become considered potentially ochratoxigenic when one of its strain is found producing OTA.

OTA has previously been reported in red pepper samples (Santos *et al.*, 2010; Ham *et al.*, 2016), dried chilli pod (Thirumala-Devi *et al.*, 2000; Jalili and Jinap, 2012; Yogendrarajah *et al.*, 2014), chilli powder (Iqbal *et al.*, 2013; Ozbey and Kabak, 2012; Rotsisen *et al.*, 2016) red pepper flakes (Tosun and Ozden, 2015), chilli sauce (Iqbal *et al.*, 2011), sweet pepper (Gambacorta *et al.*, 2018; Çagindi and Gürhayta, 2016), and paprika (Ahn *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010).

Up to now, an initial overview of the mycobiota associated with *C. annuum* L. cv. “Cacho de Cabra” and Merkén was realized by Costa *et al.* 2019b. The authors showed that 225 fungal strains were isolated from pepper samples obtained at the field, dried, and smoked phases. Merkén samples were also analysed.

Fusarium spp. (23%) and *Alternaria* spp. (14.7%) were predominant in the field ($n = 61$). Species of both genera are considered field pathogens, growing better on substrates with $a_w \geq 0.9$. According to the authors, *Penicillium* spp. (drying = 52.1%; smoked = 74.1%; $n = 43$) and *Aspergillus* (drying = 26%; smoked = 21.17%; $n = 85$) were predominant in post-harvest. The drying and smoking phases are performed to decrease the levels of moisture content (11.0% to 16.3%) and a_w (0.513 to 0.611) of the pepper pods. However, some species of *Penicillium* and *Aspergillus* can grow in low a_w conditions.

Adebanjo and Shopeju (1993) showed that in fresh *C. annuum*, *Fusarium equiseti* was the main species found, while in stored samples the incidence of both *A. alternata* and *Fusarium* spp. was low.

Casquete *et al.* (2017) isolated 67 fungal species from smoked paprika samples. Both potential aflatoxigenic *Aspergillus* species and PAT-producer *Penicillium* (*P. expansum* and *P. thomii*) were found. In these samples, mycotoxins were not detected, agreeing with other studies that had already stated that a_w conditions required for the production of mycotoxins are slightly more restricted than for growth (Magan and Aldred, 2008).

The long periods of drying and poor sanitary conditions where pepper products are stored can contribute to this gradual increase in fungal contamination levels.

Similarly, red pepper samples, even after drying, can have an increase in populations of spoilage fungi with *A. glaucus*, *A. niger* and *A. fumigatus* being dominant (Seenappa *et al.*, 1980; Adebanjo and Shopeju, 1993; Iqbal *et al.*, 2011).

Costa *et al.* 2019b also analysed Mércen samples obtained at fairs and markets. *Penicillium* (43.47%), *Aspergillus* (17%), *Fusarium* (4%) strains were predominant ($n = 23$).

Pepper powder products are very hygroscopic. Overall, where pepper powder is sold in markets in bulk, rehydration can occur which would allow mycotoxigenic fungi to become active and produce mycotoxins (Santos *et al.*, 2010). Thus, after drying they need to be effectively packaged to prevent any increase in a_w . Besides that, high-quality of Merkén is directly linked to a selection of high-quality pods.

In 2018, the Chilean Agency for Food Quality and Safety (ACHIPIA) has prepared a risk profile for Ochratoxin A in *Capsicum* pepper and Merkén. However, due to scarce information available on *Capsicum* production and OTA contamination levels in this product, it was not possible to carry out a risk assessment with representative data. Recently monitoring data for mycotoxin in *Capsicum* from 2008-2017 were published by Foerster *et al.* (2019), paying special attention to the contamination of *Capsicum* consumed and produced in Chile.

According to the Chilean Mycotoxin Surveillance Program data so far, the highest level of OTA in *Capsicum* (e.g., 416.3 µg/kg) was detected in a sample collected from the local market.

Similarly, Ikoma *et al.* (2015) showing contamination range of 163.4-1059.2 µg/kg with an average OTA amount of 355.6 µg/kg in dried red peppers from Chile. These concentrations exceed also the OTA limits established by the European Commission (EC).

Contamination of *Capsicum* and derivative products as Merkén also causes concern as OTA levels detected reached levels of 71.77 µg/kg (Chilean Ministry of Health- Minsal, 2017).

Rodriguez (2018) analysed mycotoxins contamination of Merkén from the farmers and markets of the La Araucanía region, Chile. The authors reported that Merkén samples showed a 100% OTA contamination, ranged between 0.79±0.05 to 19.81±0.70 µg/kg. The authors point out that only one sample has a higher OTA concentration (19.8 ±0.70 µg/kg) than those established by the EC.

However, even at low concentration, the constant presence of OTA/AF may be a risk as it may act in synergy with other mycotoxins. The simultaneous occurrence of different mycotoxins may increase, decrease or not act on the toxicity of these metabolites.

In Chile, *Capsicum* products are also reported as highly susceptible food matrix to aflatoxins contamination. Foerster *et al.* (2019) reported that the co-occurrence of OTA and AFs in *Capsicum* samples corresponded to 20.6% of the samples analysed by the Chilean Mycotoxin Surveillance Program. Up to now, the highest level of aflatoxins detected in Chilean *Capsicum* has been 176.4 µg/kg.

Regarding AF contamination in Merkén, up to now, only AFB₁ was detected (57%; *n*= 13) in very low concentration (0.29±0.37 to 1.67±0.32 µg/kg) (Rodriguez, 2018).

The consumption of pepper by the Chilean population is high, which is estimated to be approximately 140 g/month/person. Heretofore there is no history of outbreaks due to OTA or AF from *Capsicum* products in Chile. However, protracted consumption of foods contaminated with OTA/AF is a risk factor for human health. Several authors have been reported consume the *Capsicum* as an important risk factor for gallbladder cancer (GBC) in Chilean women (Serra *et al.*, 2002; Tsuchiya *et al.*, 2011; Asai *et al.*, 2012; Ikoma *et al.*, 2015; Nogueira *et al.*, 2015).

Overall, data on potentially mycotoxigenic mycobiota and the presence of *Capsicum* mycotoxins consumed in Chile already indicate the susceptibility of this substrate. The data reported by Foerster *et al.* (2019) reaffirmed that in Chile food contamination with mycotoxins is real and more severe than projected, especially in *Capsicum*. Therefore, it is urgent to update the regulation of mycotoxins in this country. In addition, a study across all production points of *Capsicum* will be essential to understand the general framework of the action of mycotoxins on this substrate. All this information is important to ensure the competitiveness of agricultural producers in the international market and especially for the health of the Chilean population itself.

6. National and International Legislation

Maximum limits for mycotoxins in foods are determined by the legislation of own country. In Brazil, current legislation includes MTL established for total AFs (20 µg/kg) and OTA (30 µg/kg) in *Capsicum* spp. (dry fruit, whole or crushed, and mixtures of spices). In Pakistan, the regulation for AFs in chilli powder fixes maximum tolerable limits (MTL) in 15 µg/kg for total AFs, 10 µg/kg for AFB₁ and, 7 µg/kg for OTA. As for *Capsicum* fruits, the MTL is set at 30 µg/kg for total AFs (FAO, 2018).

The European Commission (EC) established the strictest legislation for mycotoxin in food and feed for all countries of the European Union. The regulations for AFs in *Capsicum* fruits with MTL set at 10 µg/kg for total AFs (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) and at 5.0 µg/kg for AFB₁ (Commission Regulation EU N° 1881/2006). The regulation was recently updated with the maximum levels of OTA in spices of 20 µg/kg for *Capsicum* powder and 15 µg/kg for mixtures of *Capsicum* with other species (Commission Regulation EU N° 2015/1137). No maximum tolerable *Fusarium* toxin or PAT concentration has been established for pepper powder to date.

Although it is a risk factor, up to now the Chilean legislation does not regulate the maximum limits of OTA in spices. In Chile, the regulation for mycotoxin in spice, including *Capsicum*, establishes MTL set at 10 µg/kg, only for total AFs. Similarly, in Uruguay, the legislation is established only for AFs, with MTL set at 10 µg/kg for total AFs and at 5.0 µg/kg for AFB₁.

7. Conclusions

Alternaria, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium* species were predominant in *Capsicum* samples collected in Chile. In addition, spoilage fungi from *Capsicum* samples were obtained from all points of the production chain. Pointing out the susceptibility of this commodity to fungal contamination.

In the international domain, mycotoxins such as AFs, OTA, ZEN, FMs and PAT, DON, AME and AOH have been widely detected in paprika, chilli sauce, and seasonings made out of *Capsicum*. OTA and AF were the only mycotoxins analysed in Chilean peppers. In investigations carried out so far, both toxins were frequent and were present in concentrations that exceeded the limits established by international regulation (*e.g.*, EC, FDA).

Despite its economic relevance and high intake, there is a lack of information about the Chilean consumer profile of *Capsicum*. Up to now, there is no outline of the frequency, seasonality and amount of consumption of *Capsicum*, by country regions, rural and urban areas, age groups, gender and risk population.

The consumption profile, mycobiota dominate and possible mycotoxins present are essential information to establish an action plan, which aims to contribute both to the business of the small and medium producer and the population health. In addition, this information is essential to improve national legislation.

Acknowledgements

This research was funded by the Chilean National Commission for Scientific and Technological Research (CONICYT) which supports the J.C. PhD grant no 21181445, by Universidad de La Frontera (Temuco, Chile) with partial funding from the Project DIUFRO PIA 19-0001 lead by C.S., and by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) (UID/BIO/04469/2013 unit), COMPETE 2020 (POCI-01-0145-FEDER-006684) and the BioTecNorte operation (NORTE-01-0145-FEDER-000004).

8. References

- Abouzied M.M., Horvath A.D, Podlesny P.M., Regina N.P., Metodiev V.D., Kamenova-Tozeva R.M., Niagolova N.D., Stein A.D., Petropoulos E.A., Ganev V.S. 2002. Ochratoxin A concentration in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives & Contaminants*, 19:755-764.
- Adebanjo A., Shopeju E. Sources and Mycoflora Associated with some sundried vegetables in storage. 1993. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 4:255-263.
- Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (ACHIPIA). Ocratoxina A en ají y merkén, Chile. Perfil de Riesgo/ACHIPIA N° 02/2018 version N°1. Available in <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/06/Perfil-de-Riesgo-Ocratoxina-en-aji-merk--n-v1-2018-1.pdf> (access on 17/07/2018).
- Almela L., Rabe V., Sánchez T.F., López-Pérez J.P., Gabaldón J.A., Guardiola, L. 2007. Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. *International Journal of Food Microbiology*, 24:319-327.
- Ahn J., Kim D., Jang H.S., Kim Y., Shim W.B., Chung D.H. 2010. Occurrence of ochratoxin A in Korean red paprika and factors to be considered in prevention strategy. *Mycotoxin Research*, 4:279-286.
- Asai T., Tsuchiya Y., Okano K., Piscocoya A., Nishi C.Y., Ikoma T., Oyama T., Ikegami K., Yamamoto M., 2012. Aflatoxin contamination of red chili pepper from Bolivia and Peru, countries with high gallbladder cancer incidence rates. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13:5167-70.
- Battilani P., Toscano P., Van der Fels-Klerx H.J., Moretti A., Camardo Leggieri M., Brera C., Rortais A, Goumperis T., Robinson T. 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Nature Scientific Report*, 6:17.
- Blank R., Rolfs J.P., Suedekum K.H., Frohlich A.A., Marquardt R.R., Wolfram S. 2003. Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood levels and excretion of the mycotoxin in sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:6899-6905.
- Cabral LC., Terminiello L., Pinto V.F., Nielsen K.F., Patriarca A. Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 236:155-160.
- Çagindi, Ö., Gürhayta, O.F. 2016. Aflatoxins and ochratoxin A in dried eggplant and green bell pepper. *Food Control*, 70:216–220.
- Camardo Leggieri M., Decontardi S., Bertuzzi T, Pietri A, Battilani P. 2017. Modeling Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi Signaled in Cheese under Different Temperature and Water Activity Regimes. *Toxins*, 9:4-10.
- Casquete R., Rodríguez, A.; Hernández, A.; Martín, A.; Bartolomé, T.; Córdoba, J.J.; Córdoba, M.G. 2017. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins during smoked paprika production. *Journal of Food Protection*, 80:2068-2077.
- Cichewicz H., Thorpe P.A. 1996. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in mayan medicine. *Journal Ethnopharmacol*, 52:61-70.

- Costa J., Rodríguez R., Garcia-Cela E., Medina A., Magan N., Lima N., Battilani P., Santos C. 2019. Overview of Fungi and Mycotoxin Contamination in *Capsicum* Pepper and in Its Derivatives. *Toxins*, 11:1-16.
- Costa J., Rodríguez R., Santos C., Soares C., Lima N., Santos C. 2019. Mycobiota in chilli *Capsicum annum* L. and Chilean Merken. Congresso brasileiro de Micologia, Manaus, Amazonas.
- Creppy E.E., Baudrimont I., Betbeder A.M. (1998). How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin. *The Journal of Toxicological Sciences*, 23:165-172.
- EFSA (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin in food. Question N° EFSA-Q-2005-154. Adopted on 4 April 2006. *The EFSA Journal*, 365:1-56.
- European Commission Regulation (EC) N° 594/2012 of, 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regard the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2012, 176, 43-45.
- European Commission Regulation (EU) N° 2015/1137, of 13 July 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards the maximum level of Ochratoxin A in *Capsicum* spp. spices. *Off. J. Eur. Union* 2015, 185, 11-12
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Available online: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius> (accessed on 26 December 2018).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). Available online: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (accessed on 5 April 2018).
- Foerster C., Muñoz, K., Delgado-Rivera L., Rivera A., Cortés S., Müller A., Arriagada G., Ferreccio C., Rios G. 2019. Occurrence of Relevant Mycotoxins in Food Commodities Consumed in Chile. *Mycotoxin Research*, 1867-1632.
- Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Estudio De Mercado Nacional e Internacional De Aji-Merken. 2006, 1-90.
- Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Resultados y Lecciones en ají Merken con alto valor Agregado. 2010, 1-66.
- Gambacorta L., Magistà D., Perrone G., Murgolo S., Logrieco A.F. Solfrizzo M. 2018. Co-occurrence of toxigenic moulds, aflatoxins, ochratoxin A, *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in fresh sweet peppers (*Capsicum annum*) and their processed products. *World Mycotoxin Journal*, 11: 159-174.
- Govindarajan V.S., Salzer U.J. 1985. *Capsicum*-production, technology, chemistry, and quality Part 1: History, botany, cultivation, and primary processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22:109-176.
- Ham H., Kim S., Kim M.H., Lee S., Hong S.K., Ryu J.G., Lee T. 2016. Mycobiota of ground red pepper and their aflatoxigenic potential. *Journal Microbiology*, 54:832-837.
- Hochmuth G.J., Hochmuth R. 2010. Blossom-End Rot in Bell Pepper: Causes and Prevention; Institute of Food and Agriculture Science, University of Florida: Gainesville, FL, USA.
- Iqbal S.Z., Paterson R.R.M., Bhatti I.A., Asi M.R., Sheikh M.A., Bhatti HN. 2010. Aflatoxin B1 in chilies from the Punjab region, Pakistan. *Mycotox Research*, 26:205-209.
- Iqbal Q., Amjad M., Asi M.R., Arin A. 2011. Assessment of Hot Peppers for Aflatoxin and Mold Prolifera during Storage. *Journal of Food Protection*, 74(5):830-835.
- Iqbal S.Z., Asi M.R., Zuber M., Akhtar J., Saif M.J. 2013. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial chilli and chilli sauce samples. *Food Control*, 2:621-625.
- Ikoma T., Tsuchiya Y., Asai T., Okano K., Endoh K., Yamamoto M., Nakamura K. 2015. Ochratoxin contamination of red chili peppers from Chile, Bolivia and Peru showing high incidences of gallbladder cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16:5897-5991.
- INESTAT (2016). About all core data, CENSO 2016. Available at <http://www.ine.cl/estadisticas/censos/censos-de-poblacion-y-vivienda> (Visited 25 June 2017).
- Jalili M., Jinap S. 2012. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili. *Food Control*, 24:160-164.
- Jeswal P., Kumar D. 2015. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. *International Journal of Food Microbiology*, 3:1-8.

- Jiménez A.M., López de Cerain A., González-Peñas E., Bello J. 1999. A high-performance liquid-chromatographic method for the determination of ochratoxin A in human plasma. *Chromatographia*, 50:457-460.
- Kaleemullah S., Kailappan R. 2005. Drying kinetics of red chillies in a rotary dryer. *Biosystems Engineering*, 92:15-23.
- Khazaeli P., Mehrabani M., Heidari M.R., Asadikaram G., Lari Najafi M. 2017. Prevalence of Aflatoxin Contamination in Herbs and Spices in Different Regions of Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 46, 1540–1545.
- Magan N., Aldred D. Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. In *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi*; Van West, P., Avery, S., Stratford, M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; Volume 27, pp. 19–35. ISBN 9780080551272.
- Mandeel Q.A. 2005. Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159:291-298.
- Minesal (2017). Chilean Ministry of Health. <http://web.minsal.cl/nueva-alerta-por-contaminacion-de-alimento-merken/> (Visited 13 July 2017).
- Mueller L.A., Solow T.H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R., Binns J., Lin C., Wright M.H., Ahrens R., Wang, Y. 2005. The SOL genomics network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology*, 138:1310–1317.
- Nogueira L., Foerster C., Groopman J., Egner P., Koshiol J. 2015. Association of Aflatoxin with Gallbladder Cancer in Chile. *American Medical Association*, 313: 26-28.
- OECD/ECLAC, OECD Environmental Performance Reviews: Chile 2016, OECD Publishing, Paris.
- Ozbey F., Kabak B. 2012. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, 2:354–361.
- Paterson R.R.M, Lima N. 2011. Further Mycotoxin Effects from Climate Change. *Food Research International*, 44(9):2555-66.
- ProChile (2016). Ficha De Mercado Producto. El Mercado de Merkén (Ají Seco) en Argentina 2016/Oficina Comercial En Buenos Aires – Argentina, 1:1-2.
- Rodrigues P., Santos C., Venâncio A., Lima N. 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 111:877-892.
- Rodriguez R. 2018. Mycobiota in Chilean Chilli *Capsicum annuum* L. used for Merkén' s Production and Its Mycotoxin Contamination. Master's dissertation, University of Minho.
- Rotsisen N., Kanchai C., Sastraruji T., Jaikang C. 2016. Screening of ochratoxin A and B contaminated in dried chili using HPLC-fluorescence and liquid-liquid extraction. *International Journal of ChemTech Research*, 9:164-170.
- Ruiz-Moyano S., Benito M.J., Martín A., Aranda E., Hernández A., Córdoba M.G. 2009. Characterization of molds isolated from smoked paprika by PCR-RFLP and micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Food Microbiol*, 26:776-782.
- Santos L., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. 2008. *Capsicum* and Mycotoxin Contamination: State of the art in a global context. *Food Science and Technology International*, 14:5-20.
- Santos L., Marín S., Sanchis V., Ramos, A.J. 2010. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in *Capsicum* powder samples available on the Spanish market. *Food Chemistry*, 122:826–830.
- Santos L., Marín S.; Mateo E.M., Gil-Serna J., Valle-Algarra F.M., Patiño B., Ramos A.J. 2011. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in *Capsicum* powder. *International Journal of Food Microbiology*, 3:270-276.
- Sanzani S.M., Reverberib M., Geisen, R. 2016. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology*, 122:95–105.
- Seenappa M.L., Stobbs W., Krayah G. 1980. *Aspergillus* colonization of kinds of pepper during storage. *Phytopathology*, 70:218-222.
- Serra I., Yamamoto M., Calvo A., Cavada G., Baez S., Endoh K., Watanabe H., Tajima K. 2002. Association of chili pepper consumption, low socio-economic status and longstanding gallstones with gallbladder cancer in a Chilean population. *International Journal of Cancer*, 102:407-11.

- Suzuki T., Iwai K. Constituents of red pepper species: Chemistry, biochemistry, pharmacology and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. In the Alkaloids: Chemistry and Pharmacology, 1st ed.; Brossi, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1984; Volume 23, pp. 227–299. ISBN 9780124695238.
- Taniwaki M.H., Pitt J., Magan N. 2018. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23:38-43.
- Thirumala-Devi K., Mayo M.A., Reddy G., Reddy S.V., Delfosse P., Reddy D.V.R. 2000. Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chillies by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:5079–5082.
- Tosun A., Ozden S. 2015. Ochratoxin A in red pepper flakes commercialised in Turkey. *Food Additives & Contaminants*, 1:46-50.
- Toontom N., Meenune M., Posri W., Lertsiri S. 2012. Effect of drying method on physical and chemical quality, hotness and volatile flavour characteristics of dried chilli. *Food Research International*, 19:1023-1031.
- Tsuchiya Y., Terao M., Okano K., Nakamura K., Oyama M., Ikegami K., Yamamoto M. 2011. Mutagenicity and Mutagens of the Red Chili Pepper as Gallbladder Cancer Risk Factor in Chilean Women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12:471-476.
- Universidad de Chile, 2011. Encuesta Nacional de Consumo Alimentario. In: Departamento de Nutrición (Ed.), Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina.
- Wang Y., Wang L., Liu F., Wang Q., Selvaraj J.N., Xing F., Zhao Y., Liu Y. 2016. Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8(83):1-15.
- Yang F., Svensson B., Finnie C. 2011. Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: The first molecular insight into *Fusarium* seedling blight. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49:1362-1368.
- Yogendrarajah P., Jacxsens L., Saeger S., Meulenaer B. 2014. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annuum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, 46:26-34.

Qual a relevância das espécies esporocárpicas na taxonomia e sistemática de Glomeromycota?

JOBIM, Khadija¹; LIMA, Juliana Luiza Rocha¹; OLIVEIRA, Naasson Victor Laurentino²;
GOTO, Bruno Tomio^{1,2}

¹ PG Sistemática e Evolução, Departamento de Botânica e Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

² Departamento de Botânica e Zoologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
Emails: khadija_jobim@hotmail.com, julianalima184@hotmail.com, naasson18@gmail.com, brunogoto@hotmail.com

Resumo

As espécies esporocárpicas de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), filo *Glomeromycota*, compreendem organismos que produzem *clusters* ou glomerocarpos. Inicialmente, a taxonomia do filo foi impulsionada exclusivamente pela descrição de espécies esporocárpicas (1845 – 1974). Todavia, o período subsequente (1975 – 2019) foi marcado por pouca atenção a esse particular grupo de organismos, que exige esforço amostral e metodologia de coleta diferenciada dos demais fungos do filo. Das 317 espécies que o compõe, atualmente, 87 são reconhecidas como esporocárpicas e distribuídas entre as ordens *Archaeosporales*, *Diversisporales* e *Glomerales*. Apesar da diversidade filogenética e alta representatividade dessas espécies no filo, existem lacunas acentuadas no conhecimento sobre sua distribuição mundial e mecanismos de dispersão. A despeito das expectativas de diversidade para regiões tropicais, as regiões temperadas concentram maior número de espécies reportadas (60%). No Brasil, um total de 40 espécies esporocárpicas foram reportadas, com ocorrência catalogada para os cinco biomas, e das quais apenas 4 foram descritas originalmente a partir de material tipo do território. A literatura registra ainda que a zoocoria pode ser uma estratégia chave de dispersão para esse grupo de fungos. Parcela substancial das espécies não possui caracterização molecular, inviabilizando a compreensão dos aspectos evolutivos. Apenas com investimentos em coletas, adaptadas para o hábito peculiar das espécies esporocárpicas, e obtenção de dados filogenéticos, será possível elucidar questões na sistemática e evolução desse grupo de fungos.

Palavras-chave: Glomerocarpos, Glomerosporos, Micorriza, Sistemática.

1. Introdução

O filo *Glomeromycota* constitui um importante grupo de fungo componente da microbiota do solo, representado atualmente por 317 espécies, distribuídas em três classes, cinco ordens, 16 famílias e 44 gêneros (Błaszowski *et al.*, 2012, 2015, 2018, Corazon-Guivin *et al.* 2019; Goto *et al.*, 2012; Goto e Jobim, 2019; Jobim *et al.* 2019; Marinho *et al.*, 2014; Oehl *et al.*, 2011; Sieverding *et al.*, 2014; Tedersoo *et al.* 2018). Compreende os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), simbioses mutualistas de plantas terrestres e *Geosiphon pyriformis* (Kütz.) F. Wettst., exceção ao grupo, por ser o único representante do filo que se associa a algas do gênero *Nostoc* (Schüssler *et al.*, 2001).

Os FMA são responsáveis por um fenômeno generalizado na natureza, a simbiose micorrízica, que abrange cerca de 90% das famílias vegetais (Smith & Read, 1997). Esses organismos necessitam estar associados a uma raiz fisiologicamente ativa que forneça carboidratos e outros nutrientes para seu crescimento, esporulação para, assim, completar seu ciclo de vida, sendo, portanto, reconhecidos como biotróficos obrigatórios (Stürmer e Siqueira, 2013). O fungo, em contrapartida, fornece uma série de benefícios ao vegetal, maximizando a absorção de nutrientes pela planta em até 80% para o P, além de 60% de Cu, 25% de N, 25% de Zn e 10% de K (Marschne e Dell, 1994). Como consequência da habilidade das hifas externas dos FMA em absorver os nutrientes, favorecem maior tolerância a estresses ambientais, contribuindo na recuperação de áreas degradadas, ataque de patógenos, melhoria na agregação e estabilidade do solo, dentre outros atributos (Jackson e Mason, 1984; Koske e Gemma, Oliveira *et al.*, 2009; 1997; Rodríguez-Echeverría, 2006; Smith e Read 1997; Souza, 2007).

Com o avanço dos estudos moleculares, notadamente das análises filogenéticas, as últimas décadas possibilitaram inúmeros avanços na compreensão da sistemática e evolução do Reino Fungi, munindo-se de forma integrativa características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, reprodutivas e genéticas para o estabelecimento de novas taxa (Alexopoulos, 1995; Azevedo e Vazzoler, 2015). Nesse cenário, a taxonomia, sistemática e evolução dos FMA têm fomentado intensas discussões devido a constante descrição de novas espécies, assim como, pelas revisões taxonômicas em curtos períodos de tempo (Błaszowski 2012; Goto *et al.*, 2012; Oehl *et al.*, 2008, 2011; Sieverding *et al.*, 2014; Spatafora *et al.*, 2016; Tedersoo *et al.*, 2018).

A taxonomia de *Glomeromycota* é restrita as descrições de espécies esporocárpicas, período definido por Goto (2009) como “fase esporocárpica”, que vigorou de 1844 a 1974. Nesse período teve início as descrições das primeiras espécies de FMA, *Glomus macrocarpum* Tul. & C. Tul. e *G. microcarpum* Tul. & C. Tul. (Tulasne e Tulasne, 1945) e resultou exclusivamente em descrições de espécies esporocárpicas. Tais espécies, em sua maioria hipógeas, requerem técnica especial de coleta, definida por Gerdemann e Trappe (1974) como dependente de um “instinto hipógeo”, que, basicamente, se consolida a medida em que o pesquisador desenvolve experiência ao longo das expedições e aprende a visualiza-las em ambientes similares, vasculhando, procurando através da serapilheira e na superfície do solo (Figura 1). Esse método demanda bastante tempo, sendo o sucesso na obtenção de espécimes diretamente proporcional ao tempo e recursos investidos a procura, o que certamente desencoraja a busca por esses organismos (Jobim *et al.* 2019). Com o advento da técnica de peneiramento úmido e decantação de Gerdemann e Nicholson (1963), a descrição e buscas por espécies esporocárpicas tem decaído substancialmente tendo em vista o crescimento das descrições de espécies ectocárpicas (Figura 2).

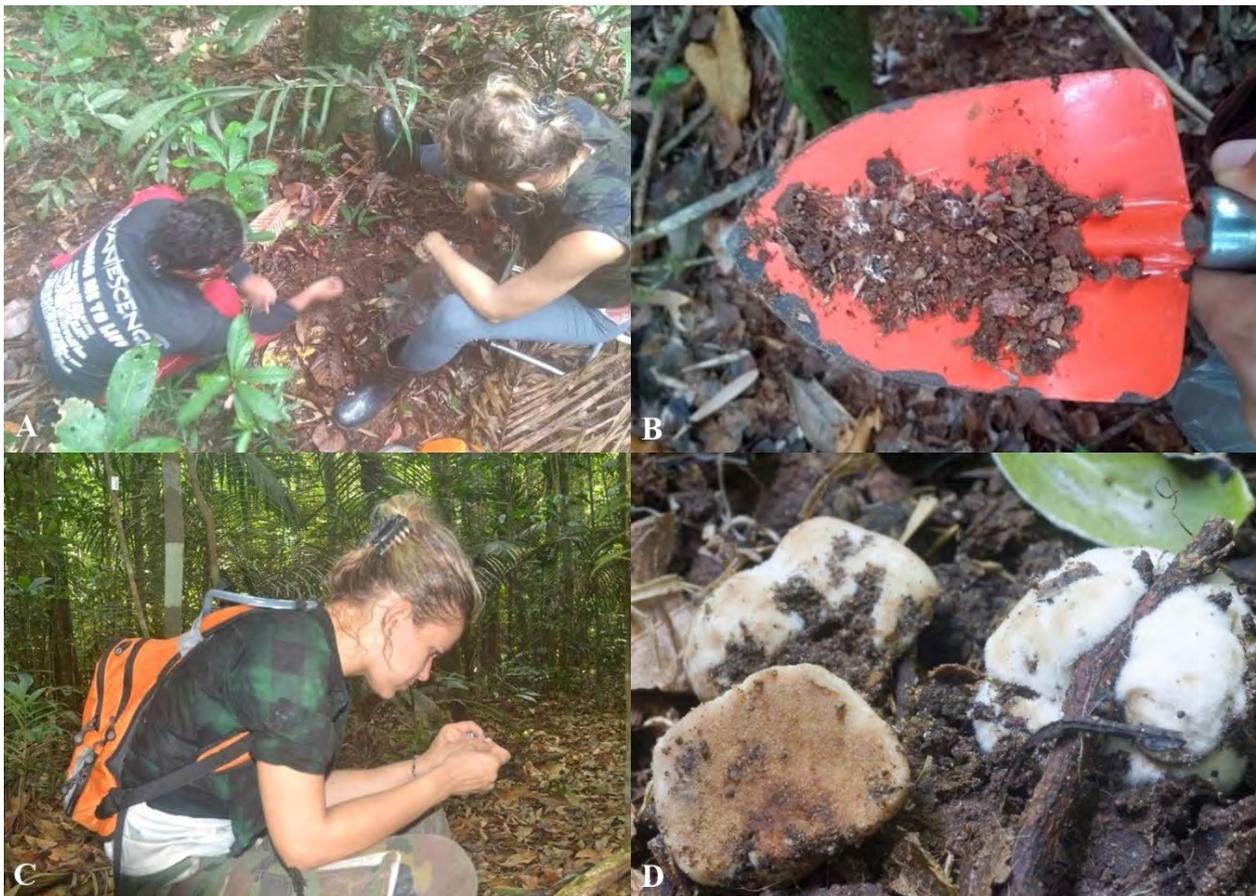
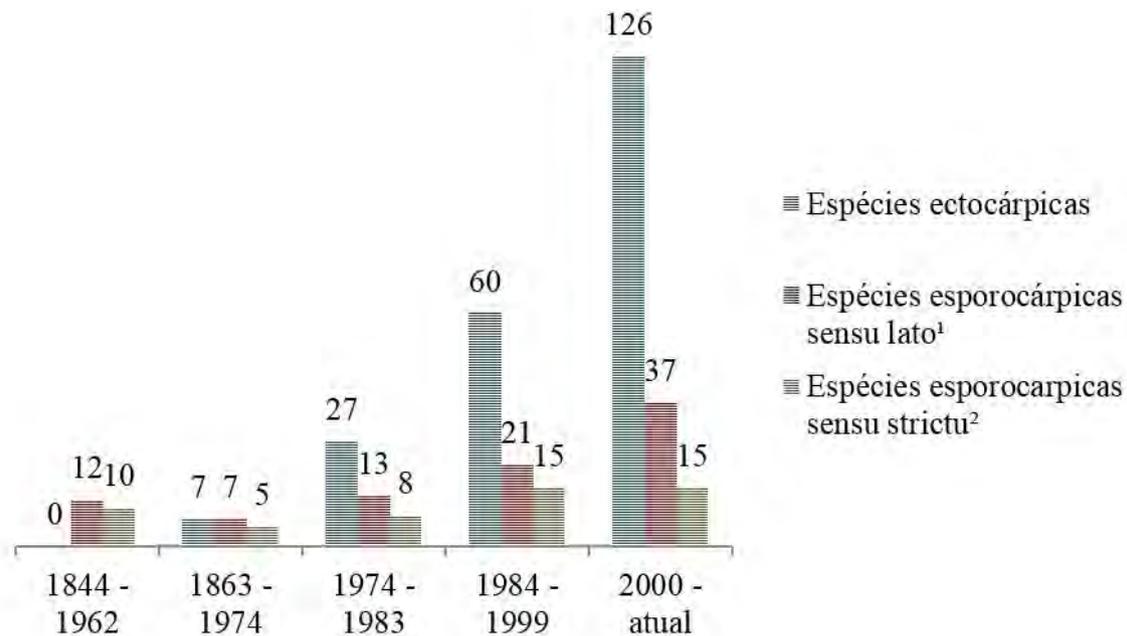


Figura 1. Coleta de espécies glomerocárpicas. **A, B e C:** Busca manual pelos potenciais substratos (solo e serapilheira). **D:** *Redeckera fulva* (Berk. & Broome) C. Walker & A. Schüßler *in loco*; foto cedida por Wagner G. Cortez.



1. Espécies que produzem clusters e/ou glomerocarpos;
2. Espécies que formam glomerocarpos exclusivamente.

Figura 2. Número de espécies esporocárpicas de FMA descritas de acordo com a fase da histórica da taxonomia de FMA sensu Goto (2009).

2. O que é espécie esporocárpica?

É importante destacar que a definição de espécie esporocárpica no filo *Glomeromycota* compreende uma ampla variação morfológica. Etimologicamente, o termo esporocarpo significa “esporos originados de um corpo de frutificação” (esporos = semente e carpo = fruto), definido no contexto do Reino Fungi como estruturas epígeas (acima da superfície do solo) ou hipógeas (abaixo da superfície do solo), contendo esporos e cobertas por uma rede de hifas (perídio), comum a diferentes filos, como *Acrasiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota* e *Mucoromycota* (Alexopoulos *et al.*, 1995; Kirk *et al.*, 2008). No filo *Glomeromycota*, o termo é aplicado para designar uma estrutura em que os glomerosporos se desenvolvem em aglomerados epígeos ou hipógeos, cobertos ou não por um perídio, abrangendo desde espécies que possuem um arranjo estruturalmente complexo, formando massas compactas (*Glomus* spp., *Sclerocarpum*) a moderadamente/frouxamente entrelaçados (e.g. *Rhizoglomus* spp. e *Diversispora* spp.), assim como espécies que possuem menor complexidade (e.g. *Dominikia* spp. *Kamieskia* spp., *G. fasciculatum* (Thaxt.) Gerd. & Trappe, *G. glomerulatum* Sieverd.), denominados *clusters* (Berch e Fortin, 1983; Gerdemann e Trappe, 1974; Goto e Maia, 2005; Jobim *et al.* 2019; Schenck e Pérez, 1990) (Figura 3).

Morton e Benny (1990) alertaram que o hábito esporocárpico é bastante variável e por isso deveria ser interpretado com cautela. Algumas espécies glomerocárpicas como *G. macrocarpum*, *G. pallidum*, *G. tenerum* também são reportadas como ectocárpicas, crescendo eventualmente em culturas (Berch e Fortin 1983; Gerdemann e Trappe 1974; Hall 1977; McGee 1986; Schüssler e Walker 2010). Além disso, análises moleculares mostraram que várias espécies originalmente descritas como *Glomus* foram tranferidas para outros gêneros (*Dominikia*, *Rhizoglomus*) ou mesmo outras ordens (*Diversisporales*, *Paraglomerales*, *Archeosporales*), sugerindo alta divergência filogenética (Błaszowski *et al.*, 2015, 2019; Jobim *et al.* 2019; Oehl *et al.*, 2011).

Diante da amplitude que o termo abrange no filo, Jobim *et al.* (2019) propuseram o termo “glomerocarpo” para restringir os aglomerados de esporos produzidos em arranjos compactos, distinguindo dos arranjos em *clusters* (Figura 4). Nesse contexto, o termo “esporocarpo” aplica-se de maneira generalista para espécies que formam

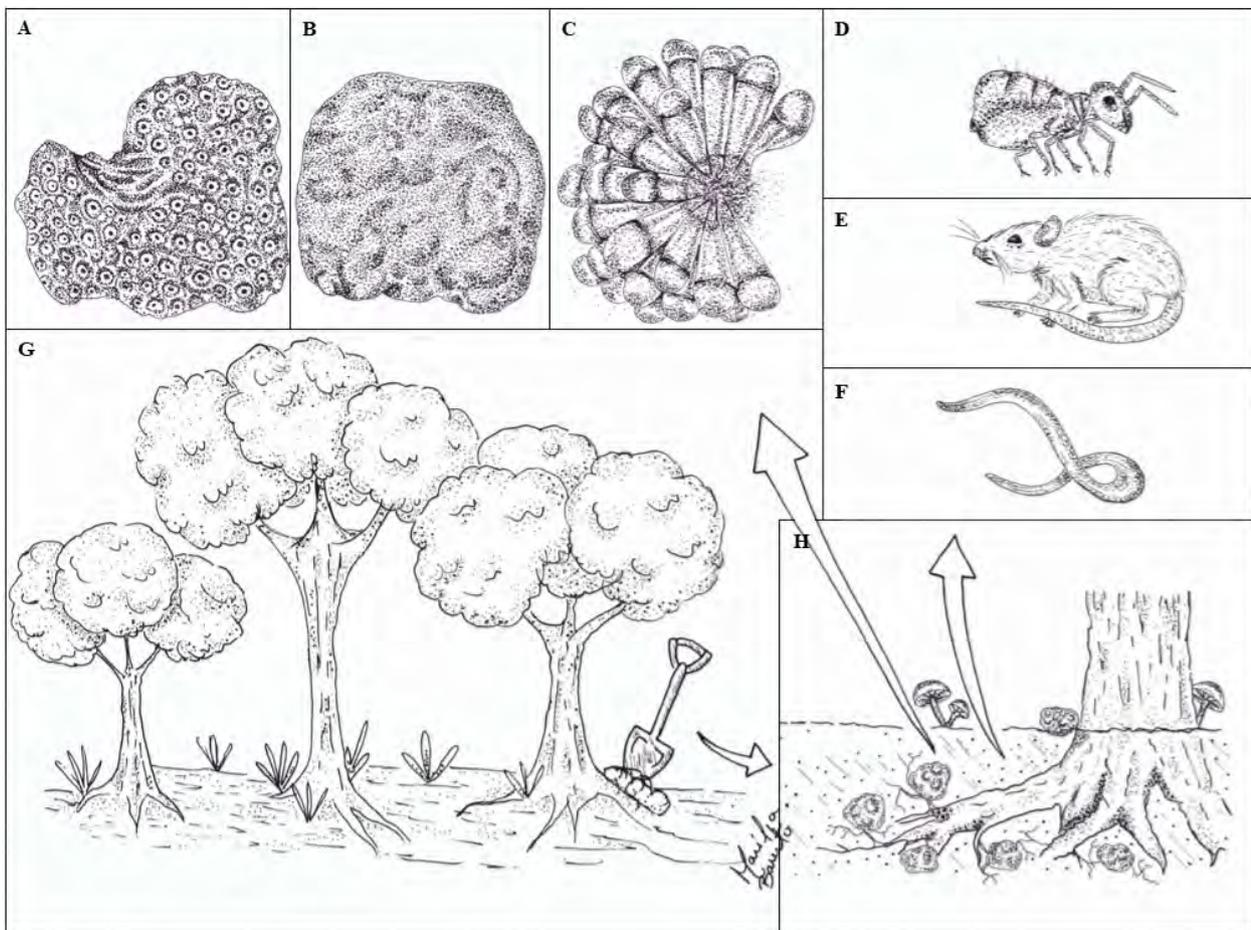


Figura 3. Representação das espécies esporocárpicas de FMA na natureza e seus veículos de dispersão. A, B e C: Diversidade macroscópica das espécies esporocárpicas de FMA. D, E e F: veículos de dispersão dos propágulos de FMA na natureza. G, H. Hábito das diferentes espécies esporocárpicas de FMA na natureza.

tanto glomerocarpos quanto *clusters*. Com isso, é possível diferenciar os glomerocarpos produzidos pelos FMA, que compreendem atualmente cerca de 54 espécies, além de inferir sua afiliação taxonômica, assim como ocorre, por exemplo, para os ascomcarpos (*Ascomycota*) e basidiocarpos (*Basidiomycota*).

Poucos estudos têm se dedicado a descrever espécies que produzem glomerocarpos a partir de metodologia de coleta compatível com sua natureza ecológica. Na história recente, considerando essa abordagem para busca por espécies glomerocárpicas, houveram poucas descobertas como, por exemplo, as descrições de *Redeckera megalocarpa* (D. Redecker) C. Walker & A. Schüßler (Redecker *et al.*, 2007), recoleta de *Glomus segmentatum* Trappe, Spooner & Ivory (Furrazola *et al.*, 2017), *Sclerocarpum amazonicum* Jobim, Błaszcz., Niezgoda, Kozłowska & B.T. Goto, *Diversispora sporocarpia* Chachuła, Mleczko, Zubek, Niezgoda, Kozłowska, Jobim, B.T. Goto & Błaszcz (Jobim *et al.* 2019) e *Rhizoglomus maiiae* Jobim, Błaszcz., Niezgoda & B.T. Goto (Błaszczowski *et al.* 2019).

Além disso, há escassez de avaliações sobre a complexidade estrutural e estabilidade dos caracteres das espécies que formam glomerocarpos como propostas por Almeida e Schenck (1990) e Wu (1993). Parte substancial das espécies descritas possuem exclusivamente dados morfológicos (77%), somado a isso ainda há sérias limitações na obtenção de informações moleculares dessas espécies, impedindo uma análise da evolução desses organismos. Essas limitações levaram muitas das espécies esporocárpicas ao *status* de *insertae sedis* por Schüßler e Walker (2010).

3. Diversidade de espécies esporocárpicas

As espécies esporocárpicas no filo *Glomeromycota* totalizam 87 representantes, atualmente compreendidos em três diferentes ordens: *Archaeosporales*: *Archaeosporaceae* (1); *Diversisporales*: *Acaulosporaceae* (1) e *Diversisporaceae* (11) e *Glomerales*: *Glomeraceae* (73) e *Entrophoraceae* (1). Isso significa, que exceto *Gigasporales* e *Paraglomerales*, diferentes ordens do filo, incluindo a mais diversa (*Glomerales*), possuem representantes que formam esporocarpos, o que explica as diferenças morfológicas observadas nos representantes conhecidos e sugere ainda que a formação de agregados (*clusters* e glomerocarpos) surgiram diversas vezes na história evolutiva dos FMA.

Os dados conhecidos sobre distribuição das espécies esporocárpicas limita a condução de análises biogeográficas. Existe uma assimetria quanto a ocorrência das espécies em relação a zona climática, com as regiões temperadas concentrando 60% desses registros, padrão que se atribui principalmente a escassez de estudos e especialistas em áreas tropicais.

Todavia, considerando as estimativas de biodiversidade para as regiões tropicais, florestas tropicais são áreas estratégicas para o direcionamento de esforços em inventários, uma vez que tais ecossistemas concentram diversos fatores favoráveis ao desenvolvimento dessas espécies como, por exemplo, alta umidade e disponibilidade de matéria orgânica bem como elevada riqueza vegetal. Isso aponta, conseqüentemente, a existência de múltiplos cenários promissores para prospecção desses fungos (Blackwell, 2011; Hawksworth e Rossman, 1997; Hawksworth, 2001).

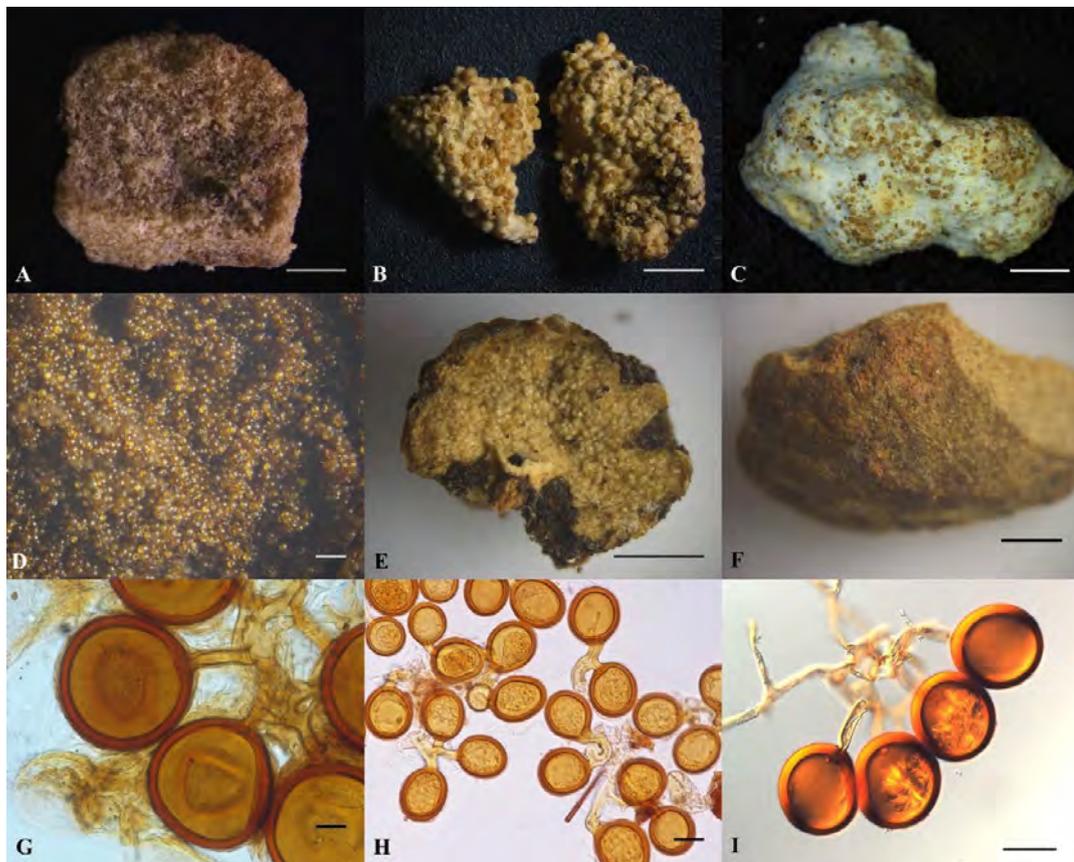


Figura 4. Diversidade de esporocarpos no filo *Glomeromycota*. **Legenda:** (A) glomeroma: *Sclerocarpum amazonicum* Jobim, Błaszcz., Niezgoda, A. Kozłowska & B.T. Goto; barra = 1 mm; (B) glomeroma: *Glomus convolutum* Gerd. & Trappe; barra = 1 mm; (C) glomeroma: *Glomus* sp. nov.; barra = 1 mm; (D) cluster: *Rhizoglomus maiiae* Jobim, Błaszcz., Niezgoda & B.T. Goto; barra = 250 µm (E) glomeroma: *Glomus radiatum* (Thaxt.) Trappe & Gerd.; barra = 1 mm; (F) glomeroma: *R. fulva*; barra = 1 mm; (G): arranjo dos glomerosporos em *Glomus ambisporum* G.S. Sm. & N.C. Schenck; barra = 25 µm (H) arranjo dos glomerosporos em *Glomus pachycaule* (C.G. Wu & Z.C. Chen) Sieverd. & Oehl; barra = 10 µm e (I) arranjo dos glomerosporos em *Glomus truffemii* B.T. Goto, G.A. Silva & Oehl. barra = 40 µm.

Nesse contexto, o Brasil desponta como uma das nações biologicamente mais ricas do planeta, compreendendo *hotspots* de biodiversidade da Mata Atlântica e do Cerrado (Mittermeier *et al.*, 2005). Estudos sobre diversidade de FMA no país são promissores, revelando muitas novas espécies (Goto *et al.*, 2008, 2012a, b, Pereira *et al.*, 2015) com alta representatividade em diferentes táxons (Goto e Jobim, 2019). O território possui registro de 40 espécies esporocárpicas em seus biomas (Tabela 1), distribuídas entre as famílias *Archaeosporaceae*, *Diversisporaceae*, *Glomeraceae* e *Entrophosporaceae*. *Glomus* e *Rhizoglomus* são os gêneros mais representativos (Figura 5), com *G. macrocarpum* e *R. clarum* sendo as espécies mais amplamente distribuídas.

Foram descritas 30 espécies de FMA a partir de material tipo brasileiro (Goto e Jobim, 2017; Jobim *et al.*, 2019; Błaszowski *et al.* 2019), das quais apenas quatro são esporocárpicas: *G. trufemii*, *R. natalensis*, *S. amazonicum* e *R. maiae*, e, dentre elas, *G. trufemii* e *R. natalensis* foram coletadas a partir da metodologia convencional de amostragem de FMA (Błaszowski *et al.*, 2014; Goto *et al.*, 2012b). *Sclerocarpum amazonicum* e *R. maiae* consistem, portanto, nas únicas espécies que produzem glomerocarpo descrita no país a partir de busca adaptada (Jobim *et al.* 2019; Błaszowski *et al.* 2019), reforçando que espécies esporocárpicas demandam atenção diferenciada da comunidade científica.

O *status* atual do conhecimento sobre a distribuição global dos FMA ainda é limitado, apesar da ubiquidade desses organismos nos ecossistemas (Davison *et al.*, 2015). Pouco se sabe, por exemplo, acerca da ecologia de dispersão desses fungos. Todavia, uma vez que os glomerosporos demonstraram alta sobrevivência em condições ambientais adversas, eles podem fornecer um verdadeiro banco de propágulos que pode eficientemente colonizar novos ambientes, como ocorre também para sementes de plantas e mesmo esporocarpos de fungos ectomicorrízicos (Davison *et al.*, 2015).

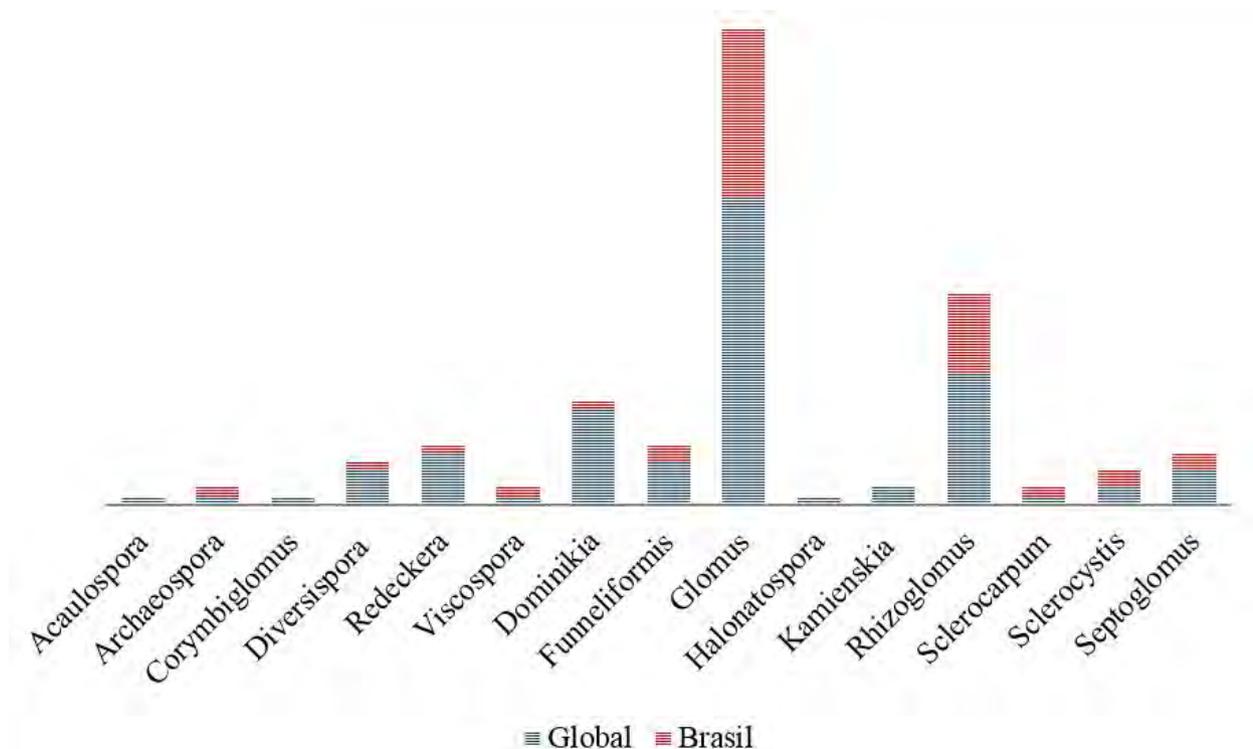


Figura 5. Registro das espécies esporocárpicas de FMA: cenário brasileiro e global.

Tabela 1. Espécies esporocárpicas de FMA registradas nos biomas brasileiros: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampas e Pantanal.

Espécies	Bioma					
	Amazônia	Caatinga	Cerrado	Mata Atlântica	Pampas	Pantanal
<i>Archaeospora myriocarpa</i> S.M. Berch			x	x		
<i>Diversispora versiformis</i> (P. Karst.) Oehl, G.A. Silva & Sieverd.	x			x		
<i>Dominikia aurea</i> (Oehl & Sieverd.) Błaszk. Chwat, G.A. Silva & Oehl				x		
<i>Funneliformis monosporus</i> (Gerd. & Trappe) Oehl, G.A. Silva & Sieverd.		x	x	x		
<i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler		x	x	x		
<i>Glomus ambisporum</i> G.S. Sm. & N.C. Schenck		x	x	x		
<i>Glomus arborensense</i> McGee		x	x	x		
<i>Glomus australe</i> (Berck.) S.M. Berch	x		x	x		
<i>Glomus brohultii</i> Sieverd. & Herrera			x	x		
<i>Glomus botryoides</i> F.M. Rothwell & Victor			x	x		
<i>Glomus clavisorum</i> (Trappe) R.T. Almeida & N.C. Schenck			x	x		
<i>Glomus fuegianum</i> (Speg.) Trappe & Gerd.			x	x		
<i>Glomus glomerulatum</i> Sieverd.		x				
<i>Glomus heterosporum</i> G.S. Sm. & N.C. Schenck		x	x	x		
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & C. Tul.	x	x	x	x	x	
<i>Glomus microcarpum</i> Tul. & C. Tul.	x	x	x	x		
<i>Glomus nanolumen</i> Koske & Gemma	x					
<i>Glomus pallidum</i> I.R. Hall			x	x		
<i>Glomus pellucidum</i> McGee & Pattinson		x				
<i>Glomus rubiforme</i> (Gerd. & Trappe) R.T. Almeida & N.C. Schenck	x		x	x		
<i>Glomus taiwanense</i> (C.G. Wu & Z.C. Chen) R.T. Almeida & N.C. Schenck ex Y.J. Yao	x		x	x		
<i>Glomus truffemii</i> B.T. Goto, G.A. Silva & Oehl		x	x	x		
<i>Redeckera fulva</i> (Berk. & Broome) C. Walker & A. Schüssler			x	x		
<i>Rhizoglossum aggregatum</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl		x		x		
<i>Rhizoglossum clarum</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Sieverd., G.A. Silva & Oehl		x	x	x	x	x
<i>Rhizoglossum fasciculatum</i> (Thaxt.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl			x	x		
<i>Rhizoglossum intraradices</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl		x	x	x		x
<i>Rhizoglossum invermaium</i> (I.R. Hall) Sieverd., G.A. Silva & Oehl			x			
<i>Rhizoglossum irregulare</i> (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) Sieverd., G.A. Silva & Oehl				x		
<i>Rhizoglossum maiae</i> Jobim, Błaszk., Niezgodna & B.T. Goto				x		
<i>Rhizoglossum manihotis</i> (R.H. Howeler, Sieverd. & N.C. Schenck) Sieverd., G.A. Silva & Oehl			x			
<i>Rhizoglossum microaggregatum</i> (Koske, Gemma & P.D. Olexia) Sieverd., G.A. Silva & Oehl			x			

Tabela 1. Continuação.

Espécies	Bioma					
	Amazônia	Caatinga	Cerrado	Mata Atlântica	Pampas	Pantanal
<i>Rhizoglyphus vesiculiferum</i> (Thaxt.) Gerd. & Trappe			x	x		
<i>Sclerocarpum amazonicum</i> Jobim, Błaszcz., Niezgoda, Kozłowska & B.T. Goto	x					
<i>Sclerocystis coremioides</i> Berk. & Broome		x	x	x		
<i>Sclerocystis sinuosa</i> Gerd. & B.K. Bakshi		x	x			
<i>Septoglyphus constrictum</i> (Trappe) Sieverd., G.A. Silva & Oehl			x	x		
<i>Septoglyphus deserticola</i> (Trappe, Bloss & J.A. Menge) G.A. Silva, Oehl & Sieverd.				x		
<i>Viscospora viscosa</i> (T.H. Nicolson) Sieverd., Oehl & F.A. Souza	x			x		

4. Dispersão de FMA

O conhecimento sobre o nicho ecológico das espécies esporocárpicas ainda é pouco explorado. São reconhecidos nos ecossistemas variados tipos de dispersão, dentre as quais recebem destaque a anemocoria (ação do vento), autocoria, (próprio organismo), zoocoria (animais) e hidrocoria (pela água) (Maragon *et al.*, 2010). No Reino Fungi, particularmente para os FMA, alguns trabalhos evidenciam potenciais vetores de dispersão, abióticos (água e vento) e bióticos (animais) (Bueno *et al.*, 2019). Apesar dos estudos não serem direcionados exclusivamente para espécies esporocárpicas, a maioria dos trabalhos verificou a ocorrência de FMA sendo dispersos principalmente por animais micófagos como mamíferos de pequeno porte (Tabela 2).

Essa estratégia permite a dispersão desses fungos, tendo em vista que os esporos ainda estão viáveis para esporulação após passagem pelo trato digestivo (Bueno *et al.*, 2019; Mangan e Adler, 2002; Sulzbacher *et al.*, 2017). No entanto, estudos que avaliam a dispersão de FMA são limitados e, tratando-se de espécies esporocárpicas, não existem trabalhos, impossibilitando predições sobre o papel desses mecanismos de dispersão.

A zona da serapilheira em que esses organismos se encontram distribuídos também pode desempenhar um importante papel em seu modo de dispersão, ou seja, as espécies que possuem hábito epígeo tendem a ter seus esporos dispersos pelas correntes de ar, embora possa existir certa dificuldade devido ao peso dos esporos já que os FMA possuem os maiores esporos do reino Fungi (Goto & Maia 2006). Os hipógeos são dependentes de

Tabela 2. Diferentes tipos de dispersão em espécies esporocárpicas de FMA. FT: floresta tropical; FC: floresta de conífera; D: deserto.

Espécies	Dispersão	Agentes dispersores	Ecossistema	País
<i>D. tenera</i> ¹	Zoocoria	Roedores	FT	Austrália
<i>F. monosporum</i> ²	Zoocoria	Roedores	FC	EUA
<i>F. mosseae</i> ²	Zoocoria	Roedores	FC	EUA
<i>G. australe</i> ¹	Zoocoria	Roedores	FT	Austrália
<i>G. fuegianum</i> ¹	Zoocoria	Roedores	FT	Austrália
<i>G. macrocarpum</i> ^{1,3}	Zoocoria	Roedores	FT	Austrália e Perú
<i>G. melanosporum</i> ²	Zoocoria	Roedores	FC	EUA
<i>G. microcarpum</i> ^{2,3,4,5}	Anemocoria e Zoocoria	Vento, roedores e artrópodes	FC, D, FT	EUA e Perú
<i>G. rubiforme</i> ²	Zoocoria	Roedores	FC	EUA
<i>R. canadensis</i> ²	Zoocoria	Roedores	FC	EUA
<i>R. clarum</i> ⁶	Zoocoria	Roedores	FT	Samoa Americana
<i>R. fasciculatum</i> ^{2,5,6}	Anemocoria e Zoocoria	Vento, roedores e artrópodes	D, FT	EUA, Samoa Americana
<i>S. coremioides</i> ³	Zoocoria	Roedores	FT	Perú

McGee e Baczocho (1994); 2. Maser *et al.* (1978); 3. Janos e Sahley (1995); 4. Rabatin e Stinner (1985); 5. Warner *et al.* (1987); 6. Adler *et al.* (2017).

pequenos animais como vetores primários de disseminação, como é o caso das espécies esporocárpicas, que não possuem mecanismo de liberação ativa dos esporos e muitos acabam se tornando dependentes de dispersão por animais (Maser *et al.*, 1978). Além disso, para alguns pequenos mamíferos, os esporocarpos hipógeos podem ser a principal fonte alimentar (Kataržytė e Kutorga, 2011), sugerindo que esse hábito constitui uma estratégia desenvolvida para dispersão, uma vez que os fungos hipógeos têm menos oportunidades que os fungos epígeos para uma dispersão abiótica eficaz (Lilleskov e Bruns, 2005).

5. Conclusões

As espécies esporocárpicas são estruturalmente diversas, possuindo diferentes níveis de complexidade com representantes em diferentes linhagens, principalmente em *Diversisporales* e *Glomerales*.

As assimetrias quanto a ocorrência global não permite compreender o padrão de distribuição desses organismos.

O Brasil é rico em espécies esporocárpicas apesar de apenas 4 das 30 espécies descritas formarem glomerocarpos.

Apenas com investimentos em coletas, adaptadas para o hábito peculiar das espécies esporocárpicas, e obtenção de dados filogenéticos, será possível elucidar questões na sistemática e evolução desse grupo de fungos.

6. Referências

- Adler G.H., Counsell E., Seamon J.O., Bentivenga S.P. 2018. Exotic rats consume sporocarps of arbuscular mycorrhizal fungi in American Samoa. *Mammalia*, 82(2): 197–200.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. 1995. *Introductory Mycology*. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 880 p.
- Almeida R.T., Schenck N.C. 1990. A revision of the genus *Sclerocystis* (*Glomaceae*, *Glomales*). *Mycologia* 86: 703–714.
- Azevedo J.L., Vazoller R.F. 2015. Taxonomia microbiana. Disponível em: <www.cria.org.br> Acesso em: 18 de maio de 2019.
- Berch S.M., Fortin J.A. 1983. Lectotypification of *Glomus macrocarpum* and proposal of new combinations: *Glomus australe*, *Glomus versiforme* and *Glomus tenebrosus* (*Endogoneaceae*). *Can J Bot*, 61: 2608–2617.
- Blackwell M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–438.
- Błaszowski J. 2012. *Glomeromycota*. W. Szafer Institute of Botany Polish Academy of Sciences, Kraków, 304 p.
- Błaszowski J., Chwat G., Góralaska A., Ryska P., Kovács G.M. 2015. Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. nov. in *Glomeromycota*. *Nova Hedwigia*, 100: 225–238.
- Błaszowski J., Niezgodą P., Goto B.T., Dalpe Y. 2018. A new genus, *Oehlia* with *Oehlia diaphana* comb. nov. and an emended description of *Rhizoglomus vesiculiferum* comb. nov. in the *Glomeromycotina*. *Nova Hedwigia*, 107(3–4): 501–518.
- Błaszowski J., Niezgodą P., Piatek M., Marguno F., Malicka M., Zubek S., Mleczko P., Yourou N.S., Jobim K., Vista X.M., Lima J.R., Goto B.T. 2019. *Rhizoglomus dalpeae*, *R. maiaae*, and *R. silesianum*, new species. *Mycologia* (in press). <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1654637>.
- Bueno C.G., Moora M. 2019. How do arbuscular mycorrhizal fungi travel?. *New Phytologist*, 222(2): 645–647.
- Corazon-Guivin M.A., Mendoza A.C., Guerrero-Abad J.C., Vallejos-Tapullima A., Carballar-Hernández S., Silva G.A., Oehl F. 2019. *Funneliglomus*, gen. nov., and *Funneliglomus sanmartinensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the Amazonia region in Peru. *Sydowia*, 71: 2019–0017.
- Davison J., Moora M., Öpik M., Adholeya A., Ainsaar L., Bâ A., Burla S., Diedhiou A.G., Hiiesalu I., Jairus T., Johnson N.C., Kane A., Koorem K., Kochar M., Ndiaye C., Pärtel M., Reier Ü., Saks Ü., Singh R., Vasar M., Zobel M. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349: 970–973.
- Furrazola E., Torres-Arias, Y., Thoen D., Barbara R.L.L., Jobim K., Goto B.T. 2016. *Glomus segmentatum*, rediscovery of a rare epigeous sporocarpic fungus to Cuba. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 6: 143–149.
- Gerdemann J.W., Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46: 235–244.

- Gerdemann J.W., Trappe, J.M. 1974. The *Endogonaceae* of the Pacific Northwest. *Micologie Memoir*, 5: 1–76.
- Goto, B.T., Maia L.C. 2005. Sporocarpic species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*), with a new report from Brazil. *Acta bot. bras.*, 19: 633–637.
- Goto, B.T., Maia, L.C. 2006. Glomerospores: a new denomination for the spore of *Glomeromycota*, a group molecularly distinct from the *Zygomycota*. *Mycotaxon*, 96: 129–132.
- Goto B.T., Maia L.C., Oehl F. 2008. *Ambispora brasiliensis* a new ornamented species in the arbuscular mycorrhiza-forming *Glomeromycetes*. *Mycotaxon*, 105: 11–18.
- Goto B.T. 2009. Taxonomia de *Glomeromycota*: revisão morfológica, chaves dicotômicas e descrição de novos táxons. Tese. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 358 p.
- Goto B.T., Silva G.A., Assis D.M.A., Silva D.K., Souza R.G., Ferreira A.C.A., Jobim K., Mello C.M.A., Vieira H.E.E., Maia L.C., Oehl F. 2012a. *Intraornatosporaceae*, (*Gigasporales*), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon*, 119: 117–132.
- Goto B.T., Jardim J.G., Silva G.A., Furrázola E., Torres-Arias Y., Oehl F. 2012b. *Glomus truffemii* (*Glomeromycetes*), a new sporocarpic species from Brazilian sand dunes. *Mycotaxon*, 120: 1–9.
- Goto B.T., Jobim, K. 2017. Uma breve história sobre a ocorrência de espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares (*Glomeromycota*) no Brasil. In: Moreira FMS, Kasuya MCM (Org.). Fertilidade e Biologia do Solo: integração e tecnologia para todos. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p 465–500.
- Goto B.T., Jobim K. 2019. Laboratório de Biologia de Micorrizas. Disponível em: < <http://glomeromycota.wixsite.com/lbmicorrizas> >. Acesso em: 08/04/2019.
- Hall I.R. 1977. Species and Mycorrhizal infections of New Zealand *Endogonaceae*. *Tran Br mycol Soc*, 68(3): 341–356.
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12): 1422–1432.
- Hawksworth D.L., Rossman A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, 87(9): 888–891.
- Jackson R.M., Mason P.A. 1984. Mycorrhiza. London: Edward Arnold, 60 p.
- Janos D.P., Sahley C.T., Emmons, L.H. 1995. Rodent dispersal of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Amazonian Peru. *Ecology*, 76(6): 1852–1858.
- Jobim K., Błaszowski J., Niezgoda P., Kozłowska A., Zubek S., Mleczko P., Chachuła P., Ishikawa N.K., Goto B.T. 2019. New sporocarpic taxa in the phylum *Glomeromycota*: *Sclerocarpum amazonicum* gen. et sp. nov. in the family *Glomeraceae* (*Glomerales*) and *Diversispora sporocarpia* sp. nov. in the *Diversisporaceae* (*Diversisporales*). *Mycological Progress*, 18:369–384.
- Jobim K., Vista X.M., Goto B.T. 2018. Updates on the knowledge of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Glomeromycotina*) in the Atlantic Forest biome - an example of very high species richness in the Brazilian landscape. *Mycotaxon*, 133(1):1–17.
- Kataržytė M., Kutorga E. 2011. Small mammal mycophagy in hemiboreal forest communities of Lithuania. *Open Life Sciences*, 6(3): 446–456.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10th ed., CABI Int. Publ., 784 p.
- Koske R.E., Gemma J.N. 1997. Mycorrhizae and succession in plantings of beachgrass in sand dunes. *American Journal of Botany* 84: 118–130
- Lilleskov E.A., Bruns T.D. 2005. Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia*, 97(4): 762–769.
- Mangan S.A., Adler G.H. 2002. Seasonal dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi by spiny rats in a neotropical forest. *Oecologia*, 131(4): 587–597.
- Marangon G.P., Cruz A.F., Barbosa W.B., Loureiro G.H., Holanda A.C. 2010. Dispersão de sementes de uma comunidade arbórea em um remanescente de Mata Atlântica, município de Bonito, PE. *Revista Verde*, 5(5): 80–87.
- Marinho F., Silva G.A., Ferreira A.C.A., Veras J.S.N., Sousa N.M.F., Goto B.T., Maia L.C., Oehl F. 2014. *Bulbospora minima*, a new genus and a new species from semi-arid Northeast Brazil. *Sydowia*, 66: 313–323.

- Marschner H., Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil*, 159: 89–102
- Maser C., Trappe J.M., Nussbaum R.A. 1978. Fungal small mammal interrelationships with emphasis on Oregon coniferous forests. *Ecology*, 59(4), 799–809.
- McGee P.A. 1986. Further sporocarpic species of *Glomus* (*Endogonaceae*) from South Australia. *Trans Brit Mycol Soc*, 87: 123–129.
- McGee P.A., Baczocha N. 1994. Sporocarpic *Endogonales* and *Glomales* in the scats of *Rattus* and *Perameles*. *Mycological Research*, 98(2): 246–249.
- Mittermeier R.A., Fonseca G.A.B., Rylands A.B., Brandon K.A. 2005. Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. *Conservation Biology*, 19: 601–607.
- Morton J.B., Benny G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*). A new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon*, 37: 471–491.
- Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J., Ineichen K, Silva G.A. 2011a. Advances in *Glomeromycota* taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2: 191–199.
- Oliveira J.R.G., Souza R.G., Silva F.S.B., Mendes A.S.M., Yano-Melo A.M. 2009. O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Botânica*, 32: 663–670.
- Pereira C.M.R., Goto B.T., Silva D.K.A., Ferreira A.C.A., De Souza F.A., Silva G.A., Maia L.C., Oehl F. 2015. *Acaulospora reducta* sp. nov. and *Acaulospora excavata*, two glomeromycotan fungi with pitted spores from Brazil. *Mycotaxon*, 130: 983–995.
- Rabatin S.C., Stinner B.R. 1985. Arthropods as consumers of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 77(2): 320–322.
- Redecker D., Raab P, Oehl F, Camacho F.J., Courtecuisse R. 2007. A novel clade of sporocarp-forming species of glomeromycotan fungi in the *Diversisporales* lineage. *Mycological Progress*, 6: 35–44.
- Rodríguez-Echeverría, S.; Freitas, H. 2006. Diversity of AMF associated with *Ammophila arenaria* ssp. *Arundinacea* in Portuguese sand dunes. *Mycorrhiza*, 16: 543–552
- Schenck N.C., Pérez Y. 1900. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Gainesville: Synergistic Publications. 286 p.
- Schüssler A., Schwarzott D., Walker C. 2001. A new phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105:1413–1421.
- Schüßler A., Walker C. 2010. The *Glomeromycota*: a species list with new families and genera. Disponível em: <www.amf-phylogeny.com>. Acesso em: 16 de maio de 2019.
- Sieverding, E., Silva, G.A., Berndt, R., Oehl, F. 2014. *Rhizoglomus*, a new genus of the *Glomeraceae*. *Mycotaxon*, 129(2): 373–386.
- Smith S.E., Read D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. San Diego: Academic Press, 800 p.
- Souza F.A., Silva I.C.L., Barbara R.L.L. 2007. Fungos Micorrízicos Arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. *Biodiversidade*, 5: 551–556.
- Spatafora J.W., Chang Y, Benny G.L., Lazarus K., Smith M.E., Berbee M.L., Bonito G., Corradi N., Grigoriev I., Gryganskyi A., James T.Y., O'Donnell K., Roberson R.W., Taylor T.N., Uehling J., White M.M., Stajich J.E. 2016 A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data *Mycologia*, 108(5): 1028–1046.
- Stürmer S.L., Siqueira J.O. 2013. Fungos Micorrízicos. In: Moreira F.M.S., Cares J.E., Zanetti R., Stürmer S.L. (Eds.). O Ecosistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Editora UFLA, p. 289–311.
- Sulzbacher M.A., Grebenc T., Giachini A.J., Baseia, I.G., Nouhra, E.R. 2017. Hypogeous sequestrate fungi in South America – how well do we know them? *Symbiosis*, 71(1): 9–17.

- Symanczik S.; Al-yahya'ei M.N., Kozłowska A., Ryska P., Błaszowski J. 2018. A new genus, *Desertispora*, and a new species, *Diversispora sabulosa*, in the family *Diversisporaceae* (order *Diversisporales*, subphylum *Glomeromycotina*). *Mycological Progress*, 17:437–449.
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., Abarenkov, K. 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal diversity*, 90: 135–159.
- Torre-Arias Y, Furrázola E, Berbara RLL, Jobim K, Lima JLR, Goto BT. 2017. *Glomus herrerae*, a new sporocarpic species of *Glomeromycetes* from Cuba. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 7:155–160.
- Tulasne L.R., Tulasne C. 1845. Fungi nonnulli hypogaei, novi v. minus cogniti act. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, 2: 35–63.
- Warner N.J., Allen M.F., MacMahon J.A. 1987. Dispersal agents of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a disturbed arid ecosystem. *Mycologia*, 79(5), 721–730.
- Wu C-G. 1993. *Glomales* of Taiwan: IV. A monograph of *Sclerocystis* (*Glomaceae*). *Mycotaxon*, 49:327–349.

Colonização das raízes de plantas da Amazônia por fungos micorrízicos arbusculares

OLIVEIRA, Luiz Antonio¹; MOREIRA, Francisco Wesen¹

¹Coordenação de Tecnologia e Inovação COTEI/INPA
Emails: luiz.oliveira@inpa.gov.br, wesen@inpa.gov.br

Resumo

As pesquisas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) na Amazônia podem ser divididas em cinco grupos: a) os primeiros trabalhos fizeram uma abordagem mais geral, identificando as espécies de plantas ou comunidades vegetais que apresentavam ou não essa associação com fungos micorrízicos. b) o segundo grupo se refere aos estudos sobre as ocorrências em plantas perenes, com ênfase na sazonalidade e variações temporais, tempo de uso da área e relações com a fertilidade do solo. c) estudos que fizeram uma abordagem quanto aos efeitos da inoculação no crescimento vegetal. d) estudos sobre as relações entre as taxas de colonização e teores de nutrientes nas folhas das plantas. As duas primeiras enfatizam as interações e fisiologia da relação e as últimas abordam os efeitos e contribuições da associação desses fungos para as plantas hospedeiras; e) o último grupo se refere aos estudos sobre a ocorrência e diversidade dos FMAs nos ecossistemas amazônicos. Os FMAs ocorrem naturalmente nas espécies vegetais regionais, sendo muito abundantes e com elevada diversidade e resiliência nos ecossistemas da Amazônia, predominando o gênero *Acaulospora*. No entanto, a esporulação e a intensidade da colonização e, os benefícios nutricionais em condições naturais se relacionam com fatores bióticos (fungos, plantas, interação) e abióticos (pH, disponibilidade de nutrientes, textura, umidade do solo, precipitação) e, à interação de ambos. De uma maneira geral, observaram-se ocorrências de hifas fúngicas nas raízes das plantas, exceto a pouca presença ou ausência nas raízes das plantas na região explorada pela Petrobrás às margens do rio urucu, Coari, Amazonas.

Palavras-chave: Associações plantas-microrganismos, Ecologia microbiana, Metabolismo vegetal e microbiano.

1. Introdução

Na Amazônia, podem-se dividir as pesquisas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) em cinco fases ou grupos, segundo Oliveira e Oliveira, 2010: a) trabalhos mais antigos, principalmente, que fizeram uma abordagem mais geral, identificando as espécies de plantas ou comunidades vegetais que apresentavam ou não associação com fungos micorrízicos presentes naturalmente nos solos. b) a segunda fase/grupo se refere aos estudos sobre as ocorrências em plantas perenes, com coletas em épocas periódicas visando avaliar o efeito da sazonalidade e variações temporais, tempo de uso da área e relações com a fertilidade do solo. c) outra fase, com poucos trabalhos publicados, teve o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação no crescimento vegetal. d) nesse grupo estão inseridos os estudos sobre as relações entre as taxas de colonização e teores de nutrientes nas folhas das plantas, como forma de verificar como as colonizações radiculares podem contribuir para a nutrição das plantas. As duas primeiras situações abordam as interações e fisiologia da relação e as últimas, os efeitos e contribuições da associação desses fungos para as plantas hospedeiras; e) finalmente, o último grupo envolve estudos sobre a ocorrência e diversidade dos FMAs nos ecossistemas amazônicos, tendo como enfoque, as situações dessa associação no meio ambiente natural. Pode-se ainda inserir nesse último grupo de pesquisas, os resultados obtidos durante 12 anos na região situada às margens do rio urucu, município de Coari, na Base de Operações Geólogo Pedro de Moura, onde os FMAs têm dificuldades de formar hifas quando associados às raízes das plantas, tendo por isso, pouca ou nenhuma contribuição para a nutrição vegetal. De uma maneira geral, observaram-se ocorrências generalizadas e diversificadas de hifas fúngicas nas raízes das plantas, exceto a pouca presença ou ausência dessas estruturas nas raízes das plantas pesquisadas na região explorada pela Petrobrás às margens do rio Urucu, município de Coari, Amazonas e, nas raízes das Lecitidáceas.

Informações mais detalhadas sobre os fatores que determinam a ocorrência e o mutualismo são imprescindíveis no entendimento e manejo dos FMAs na Amazônia.

Para não ser repetitivo, o presente trabalho mostrará alguns resultados mais recentes, obtidos após a edição do livro *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil* (Siqueira *et al.*, 2010), onde se encontra a revisão de Oliveira e Oliveira (2010) sobre as micorrizas na Amazônia.

2. Colonizações radiculares por Fungos Micorrízicos Arbusculares

2.1. Na Região Metropolitana de Manaus

Boa parte das pesquisas com fungos micorrízicos arbusculares realizadas no Estado do Amazonas foi feita na Região Metropolitana de Manaus, devido às facilidades de acesso. Alguns desses resultados são apresentados a seguir.

Na tabela 1 são apresentadas as porcentagens de colonização micorrízica arbuscular, calculadas com base na presença das estruturas totais dos fungos (hifas, vesículas, arbuscúlos e esporos) nas raízes de cacau, urucum e araçá-boi em períodos diferentes de coleta, em pesquisa realizada em 2018.

A colonização radicular por FMAs variou durante o período de coletas e o cacau mostrou-se menos colonizado do que o urucum e o araçá-boi (Tabela 1). Houve maior colonização radicular em setembro e menor em junho, representando os meses mais secos, sendo junho o início do período seco e setembro, o mês com menos precipitação durante o ano, ao se analisar dados pluviométricos anuais consolidados da região de Manaus (Ribeiro, 1976; Oliveira *et al.*, 2008). Ao contrário do urucum e araçá-boi, os cacauzeiros mostraram baixas ocorrências de FMAs no sistema radicular nos meses mais chuvosos (março e dezembro) sugerindo mais formações de novas raízes nesse período. As plantas apresentam, de um modo geral, duas estratégias para a absorção de água e nutrientes, formando mais colonizações em raízes mais grossas e sem ou com poucos pêlos radiculares e, menos colonizações em raízes finas e novas com grande quantidade de pêlos radiculares (Reinhardt e Miller, 1990; Fisher e Jayachandran, 1999; Liu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). Desse modo, as presenças dos FMAs podem servir de referência sobre a fisiologia radicular das espécies estudadas indicando qual ou quais épocas do ano as plantas emitem novas raízes responsáveis pela absorção de nutrientes e em quais essas emissões ficam limitadas, prevalecendo raízes mais espessas e velhas, com menores capacidades de absorção de água e nutrientes, quando então, as micorrizas estão mais presentes. Assim, nas condições experimentais da área em estudo, é possível que os cacauzeiros estivessem com muitas raízes finas e novas nos meses de março e dezembro, com suas formações ocorrendo mais nos meses mais secos do ano. Baixas colonizações radiculares também foram observadas no araçá-boi, mas apenas durante o mês de junho.

Diversos trabalhos foram realizados na região de Manaus avaliando a contribuição para as plantas e a sazonalidade da colonização (Oliveira *et al.*, 1999, 2003; Oliveira e Oliveira, 2003, 2004, 2005a, b), sendo esse, mais um dado de comprovação dessa característica da associação micorrízica em plantas de ciclo médio ou longo na região.

Essas diferenças entre as espécies e o efeito da sazonalidade indicam diferenças fisiológicas entre elas, mas também, situações diferentes encontradas na área experimental. É um SAF adulto, estável, com mais de 15 anos de formação, situado em uma área de baixio com uma serapilheira consolidada, onde a umidade do solo

Tabela 1. Colonização total (hifas, vesículas, esporos e arbuscúlos) por FMAs em plantas de cacau, urucum e araçá-boi cultivadas em um SAF do município de Manaus em diferentes épocas do ano (período seco e chuvoso).

Espécies	Épocas de Coleta ¹				Médias/ Espécies
	Mar/2018	Jun/2018	Set/2018	Dez/2018	
	% Colonização das raízes				
Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	7b B	20 a AB	23 a A	6 b B	14 b
Urucum (<i>Bixa orellana</i>)	30 a AB	24 a B	40 a A	29 a AB	31 a
Araçá-boi (<i>Myrciaria dubia</i>)	34 a A	17 a B	27 a AB	33 a A	28 a
Médias de épocas de coletas	24 AB	20 B	30 A	23 AB	

Obs.: Médias com letras maiúsculas iguais nas linhas ou minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Tukey a 5 %. Fonte: Gomes (2019).

é preservada pela vegetação e situação de declividade do terreno. Em vista disso, essas variações podem ser provenientes muito mais das diferenças fisiológicas das plantas do que das variações edafoclimáticas da área estudada. O araçá-boi apresentou uma maior colonização de raízes em períodos chuvosos. Setembro foi o mês em que todas as plantas apresentaram uma boa colonização (30%), sugerindo prevalência de raízes mais velhas e mais espessas nos sistemas radiculares das três espécies.

Esses resultados são diferentes dos obtidos por Oliveira e Oliveira (2003), que apresentaram a menor porcentagem de colonização em plantas de cupuaçuzeiro e pupunheira no mês de setembro (20,1% de colonização). Nesse trabalho dos autores, a época compreendida como período chuvoso no mês de fevereiro foi a que apresentou uma maior colonização (24,1%) para essas culturas. No entanto, a área experimental usada por esses autores era de platô em um latossolo argiloso com baixa retenção de água. Ainda referente à colonização micorrízica nas plantas de cupuaçu e pupunha, Silva Júnior *et al.* (2006) obtiveram uma maior colonização da pupunheira (43,95%) na estação seca nos sistemas de monocultivo e agroflorestal. O cupuaçu manteve sua maior colonização no período chuvoso (21,9 %) em monocultivo. Para as plantas de bananeira, coqueiro e jatobazeiro descritas por Costa (2010), as colonizações das raízes foram maiores nos períodos secos (bananeira nos meses de junho e agosto, coqueiro em junho e o jatobazeiro em agosto respectivamente).

No entanto, algumas interferências edáficas foram observadas nessas colonizações radiculares pelos fungos micorrízicos arbusculares (Tabela 2). Ao se analisar os dados obtidos nos meses chuvosos (março e dezembro), observou-se uma relação positiva com os teores de Mg no solo rizosférico do araçá-boi. Nos meses mais secos (junho e setembro) as relações foram mais abrangentes, envolvendo também o Ca rizosférico além do Mg, tanto para o urucum como para o araçá-boi, embora com valores de r abaixo de 0,5, indicando a presença de outros fatores nas colonizações radiculares.

Tabela 2. Valores r da correlação linear de Person entre variáveis de colonização micorrízica das raízes de cacau, urucum e araçá-boi e os teores de cálcio e magnésio na rizosfera das espécies nos períodos chuvosos e secos.

	Cacau		Urucum		Araçá-Boi	
	Ca	Mg	Ca	Mg	Ca	Mg
Período Chuvoso						
% Colonização "r" =	-0,1243	-0,1021	-0,0215	0,0629	0,7714	0,3533*
micorrízica (p)	0,9463	0,6946	0,3944	0,2408	0,0005	0,0410
Período Seco						
% Colonização "r" =	0,0304	-0,1007	0,4048*	0,3241*	0,2742**	0,2522**
micorrízica (p)	0,2901	0,6856	0,0284	0,0500	0,0691	0,0793

(*) $0,05 > p > 0,01$; (**) $0,1 \geq p > 0,05$. Fonte: Gomes (2019).

Outro estudo foi realizado em uma área da Refinaria de Manaus (REMAN), indicando que a colonização por fungos micorrízicos arbusculares no sistema radicular das espécies coletadas na área degradada da REMAN variou entre as espécies e áreas amostradas (solo revegetado e solo de landfarming) (Tabela 3). A colonização por hifas foi muito elevada, variando entre 73,7 % no lacre e 97,3 % na leucina, sendo bem maiores do que as vesículas e arbúsculos. A presença intensiva das hifas e dos arbúsculos são indicativos de que a simbiose plantas-fungos está contribuindo para uma maior absorção de água e nutrientes pelas plantas, conforme já documentado por diversos autores citados por Oliveira e Oliveira (2010). Nota-se que as porcentagens dessas estruturas exibiram diferença significativa entre as espécies. Com relação às presenças de hifas, leucena, quicuio, rabo-de-camaleão e goiaba-de-anta se mostraram com colonização superior à encontrada no lacre, sem, no entanto, diferir estatisticamente entre si. As vesículas, por outro lado se mostraram significativamente maior nas raízes do quicuio, com 63,8%. Esta espécie também apresentou maior porcentagem de arbúsculos, mas não diferiu estatisticamente do rabo-de-camaleão (50,1%). Desde modo, considera-se que a associação micorrízica está contribuindo para a manutenção das espécies presentes nestas áreas.

Silva *et al.* (2007) encontraram em áreas cultivadas com leucena e sabiá, menos de 15 % das raízes da leucena colonizadas por FMAs, valores bem inferiores aos mostrados na Tabela 3. Nesse trabalho, as colonizações maiores podem estar ligadas ao local de coleta dessa espécie, realizada em solo de landfarming. Esta é uma prática usada para a biorremediação ambiental e tem por objetivo tratar resíduos da indústria petroquímica por meio da incorporação dos mesmos ao solo e introdução de espécies de plantas que são através das hifas que os fungos exploram maiores volumes de solo para a absorção de água e nutrientes.

Espécies como o lacre e a goiaba-de-anta, que na área da REMAN se mostraram bastante colonizadas (Tabela 3), na região de Urucu mostraram-se muito pouco colonizadas, sugerindo que os fungos micorrízicos arbusculares dessa região têm alguma característica genética que os impedem de formar bastante hifas, o que foi comprovado no estudo de longo prazo na região, onde no período de 12 anos foram estudadas mais de 40 clareiras e áreas de florestas sempre com baixas ocorrências de hifas sendo observadas nas raízes das plantas.

Tabela 3. Colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas espécies coletadas em três Sistemas Agroflorestais e em uma área degradada no estado do Amazonas no mês de abril de 2014.

Espécies	Hifas	-----%-----	
		Vesículas	Arbúsculos
Lacre (<i>Vismia</i> sp.)	73,7 b	32,8 b	5,5 c
Goiaba-de-Anta (<i>Bellucia grossularioides</i>)	90,2 a	39,3 b	33,4 b
Rabo-de-camaleão (<i>Mimosa</i> sp.)	89,6 a	42,8 b	50,1 a
Quicuiu (<i>Brachiaria humidicola</i>)	93,5 a	63,8 a	57,4 a
Leucena (<i>Leucaena leucocephala</i>) *	97,9 a	32,9 b	33,6 b
Médias	87,1	41,7	33,3

* Solo de landfarming. Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %. Fonte: Silva (2014).

Tabela 4. Colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas espécies coletadas na Província de Urucu em novembro de 2006.

Espécies	Hifas	-----%-----	
		Vesículas	Col. Total
Clareira/Jazida			
RUC 37H			
Azeitona (<i>Syzygium jambolana</i> DC.)	0,0	4,0	4,0
Embaúba (<i>Cecropia peltata</i> L, C. glaziovii Sneath)	5,2	9,5	9,5
Goiaba de anta (<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana)	3,4	4,3	4,3
Lacre (<i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy)	0,0	7,2	7,2
Mata pasto (<i>Senna reticulata</i>) (Willd.) H. S. Irwin & Barneby	1,8	20,7	20,7
Médias	2,1	9,1	9,1
RUC 21/24			
Azeitona (<i>Syzygium jambolana</i> DC.)	1,6	13,6	13,6
Goiaba de anta (<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana)	6,8	48,8	48,8
Ingá (<i>Inga edulis</i> Mart.)	0,0	10,8	10,8
Lacre (<i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy)	1,6	13,2	13,2
Sucupira (<i>Bowdichia nitida</i> Spruce)	43,6	43,6	43,6
Médias	10,7	26,0	26,0
Jazida 14			
Andiroba (<i>Carapa guianensis</i>) Aublet	4,0	16,0	16,0
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>) Mart.	13,2	20,8	20,8
Mata pasto (<i>Senna reticulata</i>) (Willd.) H. S. Irwin & Barneby	8,4	20,0	20,0
Pau d'arco (<i>Tabebuia serratifolia</i>) (Vahl) Nich.	0,0	9,6	9,6
Vermelhinho (<i>Senna silvestris</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby)	6,4	21,2	21,2
Médias	6,4	17,5	17,5
Jazida 21			
Angico (<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg.)	5,8	13,8	13,8
Angelim pedra (<i>Dinizia excelsa</i> Ducke)	3,6	18,8	18,8

Tabela 4. Continuação.

Espécies	Hifas	Vesículas	Col. Total
-----%-----			
Clareira/Jazida			
Goiaba de anta (<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana)	1,6	11,6	11,6
Ingá (<i>Inga edulis</i> Mart.)	9,2	15,2	15,2
Lacre (<i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy)	0,4	22,4	22,4
	Médias	4,1	16,4
Jazida 44			
Angico (<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg.)	7,1	50,7	50,7
Angelim pedra (<i>Dinizia excelsa</i> Ducke)	4,8	21,6	21,6
Azeitona (<i>Sizygium jambolana</i> DC.)	0,4	29,6	29,6
Ingá chinelo (<i>Inga cinnamomea</i> Spruce ex Benth.)	3,9	25,9	25,9
Lacre (<i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy)	2,8	29,6	29,6
	Médias	4,2	31,5

Para comprovar isso, foi realizado um experimento no viveiro de mudas da Base de Operações Geólogo Pedro de Moura, onde amostras de solos coletados da região de Manaus serviram de inóculos de fungos micorrízicos arbusculares em um latossolo da região de Urucu (Tabela 5).

Para a realização desse experimento, foram levadas 12 amostras de solos coletados da Reserva Ducke situada na Região Metropolitana de Manaus, que serviram de inóculos no solo coletado de Urucu, no qual foram plantadas duas espécies arbóreas regionais, leguminosas, a cedrorana e o ingá-de-macaco. Foram usados saquinhos de plástico contendo capacidade para 2 kg de solo. Como forma de comparação, foi usada uma testemunha sem inóculo onde estavam presentes apenas os esporos e hifas dos fungos micorrízicos arbusculares da microbiota autóctone de Urucu.

Os fungos autóctones colonizaram 10 % das raízes de ambas as espécies, sendo que no caso do ingá-de-macaco, não se observou a presença de vesículas, apenas de hifas (tratamento testemunha).

Os fungos micorrízicos arbusculares presentes nas amostras coletadas de Manaus 1, 2, 4 e 9 proporcionaram aumentos substanciais de hifas nas raízes da cedrorana, enquanto que esses aumentos foram ocasionados, no ingá-de-macaco, pelas amostras 3 e 6, com algumas amostras resultando em menores aumentos, como as 7, 11 e 12 na cedrorana e amostras 2, 4 e 10 no ingá (Tabela 5). As demais amostras de solos de Manaus proporcionaram iguais ou menores colonizações radiculares por hifas, comprovando a baixa efetividade dos fungos micorrízicos arbusculares da região de urucu e que há também, aspectos inerentes à combinação plantas-fungos na associação de ambos os simbiossiontes.

Tabela 5. Colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em Cedrorana (*Cedrelinga catenaeformis* (Ducke) e ingá de macaco (*Inga sessilis*) (Vell.) Mart. Época seca (julho de 2012).

Inóculos (solos)	Cedrorana (<i>Cedrelinga catenaeformis</i>)			Ingá de macaco (<i>Inga sessilis</i>)		
	Hifas	Vesículas	Col. Total	Hifas	Vesículas	Col. Total
	-----%-----					
Testemunha	10,0	10,0	10,0 ef	10,0	0,0	10,0 ef
Amostra 1	52,5	47,5	52,5 a	20,0	2,5	20,0 d
Amostra 2	55,0	42,5	55,0 a	20,0	20,0	20,0 d
Amostra 3	10,0	25,0	25,0 cd	52,5	0,0	52,5 b
Amostra 4	30,0	10,0	30,0 bc	27,5	2,5	27,5 cd
Amostra 5	5,0	2,5	5,0 g	10,0	7,5	10,0 ef
Amostra 6	7,5	37,5	37,5 b	62,5	5,0	62,5 a
Amostra 7	17,5	2,5	17,5 d	7,5	0,0	7,5 f
Amostra 8	2,5	0,0	2,5 g	2,5	30,0	30,0 c
Amostra 9	37,5	2,5	37,5 b	2,5	7,5	7,5 f
Amostra 10	7,5	2,5	7,5 fg	13,0	0,0	13,0 ef
Amostra 11	13,0	0,0	13,0 def	5,0	10,0	10,0 ef
Amostra 12	15,0	0,0	15,0 def	2,5	17,5	17,5 e
Observação	Ausência de arbúsculos. Nas amostras 1 foram registrados sete esporos, amostra 2 cinco esporos. Presença de nódulos.			Ausência de arbúsculos. Nas amostras 2 e 11 foram registrados um esporo. Presença de nódulos.		

A presença de nódulos em ambas as espécies indica o potencial fixador do nitrogênio atmosférico nas condições de viveiro, esperando-se que ao serem posteriormente introduzidas nas clareiras e jazidas de Urucu, que esse potencial se manifeste de forma significativa ao ponto de contribuir para a nutrição das plantas quanto às suas necessidades de nitrogênio.

3. Conclusões

A presença de colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas raízes das plantas amazônicas é muito comum.

Há uma variação muito grande de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em plantas da Amazônia.

Foram encontradas duas situações distintas quanto à presença de hifas fúngicas nas raízes: na Região Metropolitana de Manaus elas são elevadas e, na região de Urucu, município de Coari, Amazonas, as hifas são ausentes ou esporádicas.

A inoculação de mudas com fungos micorrízicos arbusculares em solos da região de Urucu pode aumentar a colonização radicular das plantas.

Apoio Financeiro

FINEP, CNPq, FAPEAM, INPA, CAPES, Petrobras.

4. Referências

- Cabello M.N. 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiol. Ecol.* 22(3):233-236.
- Chen W., Koide R.T., Adams T.S., Deforest J.L., Cheng L. 2016. Root morphology and mycorrhizal symbioses together shape nutrient foraging strategies of temperate trees. *PNAS*, 113(31):8741-8746.
- Costa, R. S. C. 2010. *Micorrizas arbusculares em sistemas agroflorestais em duas comunidades rurais do Amazonas*. Tese de Doutorado/ Universidade Federal do Amazonas, curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, Amazonas, 140 p.
- Fisher J.B., Jayachandran, K. 1999. Root structure and arbuscular mycorrhizal colonization of the palm *Serenoa repens* under field conditions. *Plant and Soil*, 217(1-2):229-241.
- Gomes L.B. 2019. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e aspectos nutricionais em três espécies vegetais presentes em um sistema agroflorestal da Amazônia Central. Dissertação de mestrado, Agricultura no Trópico Úmido, INPA, 84 p.
- Liu, B.; Li, H.; Zhu, B.; Koide, R.T.; Eissenstat, D.M.; Guo, D. 2015. Complementarity in nutrient foraging strategies of absorptive fine roots and arbuscular mycorrhizal fungi across 14 coexisting subtropical tree species. *New Phytol.* 2015 Oct;208(1):125-36. doi: 10.1111/nph.13434.
- Nakatani A.S., Siqueira J.O., Soares C.R.F.S., Lambais M.R. 2008. Microbial communities, enzymatic activity and mycorrhizal fungi in rhizospheric soil used for Landfarming of petrochemical waste. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 32(4):1501-1512.
- Oliveira L.A., Guitton T.L., Moreira F.W. 1999. Relações entre as colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. *Acta Amazonica*, 29 (2): 183-193.
- Oliveira A.N., Oliveira L.A., Figueiredo A. 2003. Colonização micorrízica e concentração de nutrientes em três cultivares de bananeiras em um latossolo amarelo da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 33: 345-352.
- Oliveira A.N., Oliveira L.A. 2003. Sazonalidade, colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares em plantas de cupuaçuzeiro e de pupunheira na Amazônia Central, *Revista Ciências Agrárias*, 40: 145-154.
- Oliveira A.N., Oliveira L.A. 2004. Associação micorrízica e teores de nutrientes nas folhas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e guaranazeiro (*Paullinia cupana*) de um sistema agroflorestal em Manaus, Amazonas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 1063-1068.

- Oliveira A.N., Oliveira L.A. 2005a. Colonização por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes em cinco cultivares de bananeiras em um latossolo da Amazônia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 481-488.
- Oliveira A.N., Oliveira L.A. 2005b. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in plants of *Theobroma grandiflorum* Schum. and *Paullinia cupana* Mart. of an agroforestry system in Central Amazonia, Amazonas state, Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 262-270.
- Oliveira A.N., Oliveira L.A. 2010. Micorrizas arbusculares no bioma Amazônia In: Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. 1 ed. Lavras, UFLA, v.1, p. 251-277.
- Oliveira F.M., Araújo R.L., Carvalho J.S., Costa S.S. 2008. Determinação da variação no microclima de Manaus-AM por atividades antropogênicas e modulações climáticas naturais. *Acta Amazonica*, 38(4):687-700.
- Reinhardt D.R., Miller R.M. 1990. Size classes of root diameter and mycorrhizal fungal colonization in two temperate grassland communities. *New Phytol.*, 116:129-136.
- Ribeiro M.N.G. 1976. Aspectos climatológicos de Manaus. *Acta Amazonica*, 6(2):229-233.
- Silva F.B., Salviano A.A.C., Andrade J.B. 2007. Áreas degradadas em microbacia de Gilbués-PI utilizando imagens do sensor CCD-CBERS-2. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Florianópolis: INPE. P. 4257-4260.
- Silva E.D. 2014. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em sistemas agroflorestais e na Refinaria de Manaus Isaac Sabbá. Dissertação de mestrado, Agricultura no Trópico Úmido, INPA. 47 p.

Coccidioidomicose: uma doença negligenciada no Nordeste brasileiro

CORDEIRO, Rossana de Aguiar

Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica. Universidade Federal do Ceará
Email: rossanacordeiro@ufc.br

Resumo

A coccidioidomicose (CM) é uma doença predominantemente pulmonar que acomete o homem e várias espécies de mamíferos, ocorrendo exclusivamente nas Américas. A CM é causada por duas espécies crípticas que apresentam um padrão de distribuição característico: *Coccidioides immitis* ocorre na Califórnia, Estados Unidos e *C. posadasii* possui distribuição mais ampla, sendo encontrado no sudoeste dos Estados Unidos e demais países da América Latina. No Brasil, a CM está restrita às áreas semiáridas do sertão nordestino, onde, desde 1978, são descritos casos esporádicos da doença. Apesar da gravidade das formas clínicas, a CM não está incluída na relação de doenças de notificação compulsória em nosso país e, assim, dados epidemiológicos são escassos e fragmentados. Sabendo-se que as doenças negligenciadas tropicais correspondem a enfermidades infecciosas / parasitárias que acometem populações economicamente desfavorecidas e que despertam pouco interesse na indústria farmacêutica, o presente artigo expõe argumentos que advogam a favor da inclusão da CM na relação de doenças negligenciadas em nosso país.

Palavras-chave: Doenças tropicais negligenciadas, Infecções fúngicas, Micoses endêmicas, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*.

1. Introdução

A coccidioidomicose (CM) é uma micose profunda, predominantemente pulmonar, causada pelos fungos dimórficos *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* – espécies crípticas que possuem áreas de ocorrência distintas: *C. immitis* limita-se ao sudoeste da Califórnia, Estados Unidos e *C. posadasii* ocorre por todas as Américas. Até o presente considera-se que as espécies causam doença clinicamente idêntica (Kirland, 2016).

A CM ocorre exclusivamente nas Américas, entre as latitudes 40° N e 40° S, desde o norte da Califórnia nos Estados Unidos até a Patagônia Argentina. A área mais importante de ocorrência de CM situa-se nos Estados Unidos, onde são reportados aproximadamente 150.000 casos anuais da doença (Galgiani *et al.*, 2005). Contudo, estima-se que o número de casos de CM naquele país aproxima-se de centenas de milhares, uma vez que estados onde a doença ocorre, tais como Texas, Oklahoma e Colorado, não realizam notificação obrigatória aos órgãos de saúde (Kollath *et al.*, 2019). A doença impacta os custos da assistência médica nos EUA: análise de 25.000 admissões hospitalares relacionadas à CM na Califórnia, entre os anos 2010 e 2011, revela gastos superiores a dois bilhões de dólares (Sondermeyer *et al.*, 2013).

A segunda maior casuística de CM ocorre no México, onde até o ano de 1994 era reportado uma média de 1.500 casos anuais. Contudo, desde 1995, a CM foi removida da lista de doenças de notificação compulsória naquele país e, assim, dados clínico-epidemiológicos podem ser acessados apenas em publicações científicas (Laniado-Laborin *et al.*, 2019). O país também possui elevados índices de reatividade cutânea aos antígenos de *Coccidioides*, especialmente nos estados localizados próximos à fronteira México-Estados Unidos (Kollath *et al.*, 2019). São reconhecidas áreas autóctones de CM nas Honduras, Guatemala, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Argentina. Apenas em 1998 o Brasil foi incluído na lista internacional de países com áreas endêmicas da doença (Pappagianis, 1998). Todavia, nenhum desses países possui um sistema nacional de notificação de CM, o que compromete o conhecimento da epidemiologia da doença nas Américas (Kollath *et al.*, 2019).

A CM acomete o homem e uma grande variedade de espécies de mamíferos, tais como cães e equinos, após a inalação de arthroconídios infectantes oriundos da fase filamentosa do ciclo biológico fúngico. Os arthroconídios

inalados geralmente escapam à morte mediada pela fagocitose de macrófagos pulmonares e sofrem mudanças morfológicas complexas, originando estruturas leveduriformes denominadas esférulas. Estas, por sua vez, sofrem diversas divisões mitóticas de seu núcleo, originando centenas de endósporos em seu interior, os quais são liberados quando as esférulas se tornam maduras. Cada endósporo pode iniciar o desenvolvimento de uma nova esférula, resultando em um crescimento exponencial do número de estruturas parasitárias. Eventualmente, os endósporos podem retornar ao solo, onde então crescem na forma filamentosa, garantindo a continuidade do ciclo biológico do microrganismo (Chiller *et al.*, 2003).

A CM pode se apresentar nas formas assintomática, pulmonar aguda, pulmonar crônica e disseminada. Até 65% dos indivíduos expostos aos artroconídios não desenvolvem manifestações clínicas, sendo detectados apenas por meio de testes sorológicos e positividade a antígenos intradérmicos. Infecção sintomática pode ocorrer em aproximadamente 40% dos indivíduos expostos, após 10 a 15 dias de incubação. A forma pulmonar aguda pode cursar com diversos sintomas clínicos tais como febre alta, tosse inicialmente seca que evolui para tosse produtiva, dor torácica tipo pleurítica, adinamia, fadiga muscular, perda de peso ponderal. Alguns pacientes podem desenvolver manifestações tipo eritema nodoso e/ou eritema multiforme. A forma pulmonar primária pode regredir espontaneamente ao curso de alguns meses, mesmo sem terapia específica (Chiller *et al.*, 2003; Galgiani *et al.*, 2016).

CM pulmonar primária pode evoluir para forma crônica, com lesões nodulares e doença fibrocavitária (Chiller *et al.*, 2003). Essa forma possui semelhanças clínicas, radiológicas e histopatológicas com a tuberculose pulmonar, doença de grande importância epidemiológica em nosso meio; relatos da literatura atestam que alguns pacientes com CM já foram tratados erroneamente com fármacos anti-tuberculose (Gomes *et al.*, 1978; Moraes *et al.*, 1988).

A CM disseminada pode ocorrer entre 1 e 5% dos indivíduos infectados, mesmo sem manifestações pulmonares. A doença é mais comum em indivíduos com imunossupressão e surge após disseminação linfática e/ou hematogênica, podendo atingir pele, ossos, aparelho urogenital e sistema nervoso central. Quando não diagnosticada e tratada adequadamente, a CM disseminada possui elevada letalidade (Chiller *et al.*, 2003; Galgiani *et al.*, 2016).

2. A Coccidioidomicose no Brasil

O primeiro caso de CM no Brasil foi descrito por Gomes *et al.* (1978), em paciente natural de Pirapiranga, região do semi-árido do Estado da Bahia. Um ano depois, Vianna *et al.* (1979) descreveram o segundo caso autóctone de CM em paciente originário de Floriano, no Estado do Piauí. Após um intervalo de 10 anos, a doença é novamente detectada em paciente provindo do município de Jaguaribara, no Estado do Ceará (Kuhl *et al.*, 1996). Todos esses casos, no entanto, prescindem de confirmação laboratorial, com diagnóstico firmado por achado histopatológico.

A comunidade científica só voltou sua atenção para a CM após o relato da primeira microepidemia da doença, ocorrida em 1991, no município de Oeiras, Estado do Piauí, onde três indivíduos e oito cães apresentaram quadro respiratório agudo após participarem de uma caçada a tatus (Wanke, 1999). Três anos depois, Sidrim *et al.* (1997) e Silva *et al.* (1997) relataram a segunda microepidemia de CM no Brasil, ocorrida em 1995, no Município de Aiuaba, região sudoeste do Estado do Ceará, onde quatro homens e dois cães apresentaram a forma pulmonar da doença após caça a tatus. A partir dessa época, diversos autores têm relatado, de forma cada vez mais frequente, outros casos da doença no Nordeste brasileiro, especialmente nos Estados do Piauí e Ceará. A mais recente área de ocorrência da CM no Brasil é o município de Serra Talhada, no sertão do Estado de Pernambuco, onde quatro indivíduos apresentaram a forma pulmonar aguda da doença (Araújo *et al.*, 2018; Lima-Neto, R. G., Universidade Federal de Pernambuco, comunicação pessoal).

No Brasil, a doença ocorre exclusivamente na região Nordeste, onde, desde 1978, aproximadamente 140 casos da doença foram divulgados: Piauí, 100 casos; Maranhão, seis casos (Eulálio, 2001; Deus Filho *et al.*, 2010), Ceará, 30 casos (Martins *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2010; Brilhante *et al.*, 2012), Bahia, dois casos (Eulálio, 2001), Pernambuco, quatro casos (Araújo *et al.*, 2018; Lima-Neto, comunicação pessoal).

Os casos de CM ocorridos no Brasil compartilham diversas características clínico-epidemiológicas: além da origem biogeográfica (Nordeste brasileiro), todos os pacientes eram do sexo masculino, com idade variando entre 11 e 82 anos, embora a maioria deles tivesse idade entre 25 a 45 anos. Os pacientes eram oriundos de região

semiárida da zona rural e praticamente todos participaram de caçadas a tatus pelo menos duas semanas antes de adoecer. Quase todos os casos tiveram início entre os meses de setembro e janeiro, época de estiagem chuvas no Nordeste brasileiro. Apenas dois pacientes apresentaram doença crônica; 134 pacientes apresentaram CM na forma pulmonar aguda. Manifestações cutâneas foram descritas em 32 pacientes e incluíam reações de hipersensibilidade, tais como eritema nodoso e eritema multiforme (Deus-Filho *et al.*, 2010). Um paciente desenvolveu pericardite sem envolvimento pulmonar (Brilhante *et al.*, 2008). Embora não existam dados clínico-epidemiológicos oficiais, a literatura científica indica que apenas dois casos de doença pulmonar aguda evoluíram para o óbito, a despeito do tratamento com antifúngicos. Todos os pacientes foram atendidos em hospitais da rede do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde.

2.1. Dados oficiais: um problema sintomático

A falta de um sistema de notificação nacional dos casos compromete o entendimento do impacto da CM em nosso país e impossibilita o estabelecimento de um sistema de vigilância e controle da doença.

À guisa de exemplo, a busca por óbitos causados pela CM no período compreendido entre 1996 e 2017 no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde) revela 48 eventos, sendo assim distribuídos: cinco na Região Norte, 22 na Região Nordeste, nove na Região Sudeste, 11 Região Sul e um na Região Centro-Oeste. Por sua vez, dados obtidos pelo DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, Ministério da Saúde) mostram que, no ano de 2011, ocorreram 829 casos de CM no país. Dados fornecidos pelo SIH-SUS (Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde, Ministério da Saúde) mostram que, entre os anos 2000 e 2007, ocorreram 400 casos de CM ao ano, com a maioria destes nos estados das Regiões Sul e Sudeste (MS, 2011). Em adição, dados referentes aos casos de CM no Maranhão, Piauí, Ceará e Pernambuco não estão disponíveis após busca do termo “coccidioidomicose” em *home page* das secretarias estaduais de saúde.

Uma das mais importantes estratégias de investigação epidemiológica das populações expostas ao fungo corresponde aos testes intradérmicos. Nessa abordagem, são empregados esferulina ou coccidioidina – antígenos estruturais obtidos das fases parasitária e saprofítica de *Coccidioides* spp., respectivamente. Até o momento foram realizados apenas dois testes dessa natureza no Brasil. Em 1991, Wanke *et al.* (1999) realizaram teste intradérmico com esferulina em 20 indivíduos relacionados aos casos da primeira microepidemia de CM, ocorrida em Oeiras, Piauí, encontrando reatividade em apenas um deles. Em 1993, Diógenes *et al.* (1995) realizaram inquérito epidemiológico com esferulina em 87 moradores da localidade de Poço Comprido (Jaguaribara, Ceará). O estudo demonstrou índice de reatividade ao antígeno de aproximadamente 12%, sugerindo, assim, a existência de coccidioidomicose-infecção no Estado do Ceará.

Este cenário sugere que, embora a CM ocorra há mais de duas décadas no Nordeste brasileiro, a produção literária científica – na forma de artigos em periódicos indexados, comunicações em congressos e reuniões científicas, dissertações de mestrado e teses de doutorado – não foi capaz de despertar a atenção das autoridades responsáveis pela vigilância epidemiológica da doença em níveis municipal, estadual e federal.

3. Micoses e Doenças tropicais negligenciadas

As doenças negligenciadas correspondem a um grupo de doenças infecto-parasitárias endêmicas entre populações com acesso limitado à saúde e educação e baixa renda *per capita* na África, Ásia e América Latina. São também conhecidas como doenças tropicais negligenciadas (DTN) e são responsáveis por até 500 mil óbitos anuais (Martins-Melo *et al.*, 2016). Essas enfermidades não apenas ocorrem em situação de pobreza, mas também contribuem para o quadro de desigualdades, uma vez que comprometem o desenvolvimento social dos países afetados (MS, 2010).

As DTN ocorrem geralmente em populações rurais ou, ainda, em populações vivendo nas periferias de grandes centros urbanos, em que as condições de infraestrutura são precárias (ausência de pavimentação, solo exposto, etc.) e/ou que não dispõem de saneamento básico (abastecimento, tratamento e distribuição de água, esgotamento sanitário e coleta de lixo). O manejo terapêutico dessas doenças baseia-se em fármacos com moderada ou alta toxicidade, ou ainda, drogas que permitem apenas o controle de sinais e sintomas clínicos, mas que não garantem a cura da doença. Há pouca pesquisa voltada para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros para

o tratamento das DTN. Ademais, testes de diagnóstico rápidos e sensíveis podem não estar disponíveis comercialmente; em alguns casos, testes modernos possuem custo elevado sendo, portanto, inacessíveis às populações atingidas. Os governos locais falham no controle de todas as etapas do ciclo dessas doenças, desde o combate aos vetores / hospedeiros intermediários (insetos, moluscos, felinos, etc.) à notificação dos casos, até mesmo de óbitos. Alterações no meio ambiente decorrentes de ação antrópica direta (desmatamento, transposição de rios, uso intensivo de inseticidas na agricultura, etc) ou indireta (aquecimento de águas oceânicas, enchentes, desertificação, etc.) podem facilitar a evolução dos agentes causadores de DTN e aumentar a vulnerabilidade das populações humanas a essas infecções. Em virtude da elevada endemicidade e baixa letalidade, as DTN despertam pouco interesse da indústria farmacêutica, inclusive no desenvolvimento de quimio / imunoprofiláticos.

Segundo a OMS, por meio do Plano Global de Combate a Doenças Tropicais Negligenciadas 2008-2015 (*Global Plan to Combat Neglected Tropical Diseases 2008-2015*), são consideradas DTN: Doença de Chagas, tripanossomose humana africana, leishmaniose, dracunculíase, equinococose, fasciolíase, filariose linfática, oncocercose, hanseníase, boubá, dengue, chinkungunya, raiva, sarna, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo, teníase / cisticercose, tracoma, envenenamento por picada de cobra. Recentemente, a cromoblastomicose e os micetomas (eumicetoma e actinomictoma) foram incluídos na relação de doenças negligenciadas tropicais pela OMS (WHO, 2017). Apenas a tripanossomose humana africana e a dracunculíase não ocorrem no Brasil.

Embora apenas o micetoma e a cromoblastomicose constituam as micoses arroladas na lista da OMS, diversos pesquisadores advogam pela inclusão de outras infecções fúngicas na relação de DTN: histoplasmosse, paracoccidioidomicose, criptococose, entomofotoromicose, Doença de Jorge Lobo, esporotricose urbana zoonótica e esporotricose associada a HIV (Freitas *et al.*, 2014; The Neglected Histoplasmosis in Latin America Group, 2016; Molloy *et al.*, 2017; Queiroz Telles *et al.* 2017; Rodrigues, 2018; Falci *et al.*, 2019; Griffiths *et al.*, 2019). Segundo os autores, essas infecções acometem populações socialmente vulneráveis, que padecem da falta de políticas de saúde globais para o controle dessas doenças, as quais são financeiramente pouco atrativas para a indústria farmacêutica.

No Brasil, estima-se que as doenças fúngicas graves acometem mais de três milhões de indivíduos (Giacomazzi *et al.*, 2015), trazendo grande impacto ao sistema de saúde: o custo do tratamento pode ultrapassar 400 mil reais por paciente (Borba *et al.*, 2018).

4. A coccidioidomicose é uma doença negligenciada

A despeito do grande número de casos nos Estados Unidos, a CM é entendida como uma doença negligenciada naquele país, haja vista o número reduzido de pesquisas sobre tema (Kirkland, 2016). Uma vez que a primo-infecção confere imunidade permanente, a CM é uma doença de grande potencial imunoprevenível. Contudo, os estudos sobre uma vacina capaz de evitar a doença, reduzir a sua incidência ou prevenir as formas graves em grupos de risco, não avançaram muito desde 1960 (Kirkland, 2016). A produção de uma vacina moderna e segura possui custos elevados com testes clínicos, patentes e produção em larga-escala, fazendo necessária colaboração direta com a indústria farmacêutica. No entanto, as companhias farmacêuticas têm revelado pouco interesse até o momento, provavelmente devido ao fato de que a CM é uma doença geograficamente limitada nas Américas (Kirkland, 2016).

No Brasil, a CM ocorre em áreas rurais do semiárido Nordeste, geralmente distantes das sedes administrativas dos Estados. São regiões que possuem baixos IDH¹ e que sofrem há décadas com a desertificação da terra, o êxodo rural e estagnação econômica. As populações atingidas pela CM possuem pouca visibilidade social e não têm acesso adequado aos serviços de atenção primária em saúde. Observa-se também pouco interesse dos órgãos de vigilância epidemiológica, haja vista a ausência de um programa de notificação compulsória dos casos da doença. A CM enquadra-se no grupo das doenças órfãs, posto que acomete um número reduzido de indivíduos, sendo de interesse limitado para médicos e pesquisadores (Lauer, 2017).

1 * IDH, Índice de Desenvolvimento Humano. Indicador criado pela ONU para avaliar qualidade de vida e desenvolvimento econômico de uma população. Os resultados variam de 0, para uma dada população sem desenvolvimento e 1,0, para uma população plenamente desenvolvida. Em 2017, o IDH do Brasil foi 0,759 e a região com maior índice concentrou-se no Distrito Federal, com IDH 0,824. Em contrapartida, os estados com casos de CM possuem IDH bastante inferiores: Ceará, 0,682; Pernambuco, 0,673; Piauí, 0,646. Para fins comparativos, o Estado de Alagoas situa-se no extremo inferior dessa escala, com IDH 0,631.

5. Conclusões

A CM é uma infecção grave que ocorre no semiárido do Sertão nordestino.

A doença é provavelmente sub-detectada no Brasil, embora tenha notificação sugerida por tratar-se de agravo inusitado.

Os dados ora apresentados indicam que a CM se enquadra na definição de doença tropical negligenciada.

Faz-se necessário o desenvolvimento de políticas públicas de prevenção e controle da doença, além de maior incentivo às pesquisas científicas.

A CM precisa ganhar importância no ensino das doenças infecciosas nas faculdades médicas públicas e privadas no Brasil.

6. Referências

- Araújo, P. S.R., Souza-Junior, V.R., Padilha, C.E., Oliveira, M.I., Arraes, L.C., Vieira, R., Antunes, A., Lima-Neto, R.G., Marsden, A. 2018. Coccidioidomycosis: first cases reported in Pernambuco, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 60:75.
- Borba, H.H.L., Steimbach, L.M., Riveros, B.S., Tonin, F.S., Ferreira, V.L., Bagatim, B.A.Q., Balan, G., Pontarolo, R., Wiens, A. 2018. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses* 61(10):754-763.
- Brilhante, R, S, Cordeiro, R.A., Rocha, M.F, Fechine, M.A., Furtado, F.M., Nagao-Dias, A.T., Camargo, Z.P, Sidrim, J.J. 2008. Coccidioidal pericarditis: a rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. *J Med Microbiol* 57(Pt 10):1288-1292.
- Brilhante, R.S., Moreira Filho, R.E., Rocha, M.F, Castelo-Branco, D.S., Fechine, M.A., Lima, R.A., *et al.* 2012. Coccidioidomycosis in armadillo hunters from the State of Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107:813-815.
- Chiller, T.M., Galgiani, J.N, Stevens, D.A. 2003. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am.* 17(1):41-57.
- Cordeiro, R.de A., Brilhante, R.S., Rocha, M.F, Bandeira, S.P, Fechine, M.A., de Camargo, Z.P, Sidrim, J.J. 2010. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66(1):65-72.
- Costa, F.A., Reis, R.C., Benevides, F, Tomé, G.S., Holanda, M.A. 2001. Coccidioidomycose pulmonar em caçador de tatu. *J Pneumol* 27(5):275-278.
- Deus-Filho, A., Meneses, A.O., Lira, A.L.A., Deus, A.C.B., Soares, A.S. 2010. Manifestações cutâneo-mucosas da coccidioidomycose: estudo de trinta casos procedentes dos estados do Piauí e Maranhão. *An Bras Dermatol* 85(1):45-51.
- Diógenes, M.J.N., Jamacuru, W.F, Silva, M.A.B., Carvalho, F.F. 1995. Inquérito epidemiológico com esferulina em Jaguaribara, CE, Brasil, 1993. *An Bras Dermatol* 70:525-529.
- Eulálio, K.D. Coccidioidomycose: uma doença emergente no Brasil. Proceedings of II Encontro Brasileiro de Coccidioidomycose and of XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006 Mar 4-8; Teresina. Brasília: SBMT; 2006, p. 72.
- Eulálio, K.D., de Macedo, R.L., Cavalcanti, M.A., Martins, L.M., Lazéra, M.S., Wanke, B. 2001. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. *Mycopathologia* 149(2):57-61.
- Falci, D.R., Monteiro, A.A., Braz Caurio, C.F, Magalhães T.C.O., Xavier, M.O., Basso, R.P., Melo M, Schwarzbald, A.V., Ferreira, P.R.A., Vidal, J.E., Marochi, J.P, Godoy, C.S.M., Soares, R.B.A., Paste. A.; Bay, M.B., Pereira-Chiccola, V.L., Damasceno, L.S.,
- Leitão., T.D.M.J.S., Pasqualotto, A.C. 2018. Histoplasmosis, an underdiagnosed disease affecting people living with HIV/AIDS in Brazil: results of a multicenter prospective cohort study using both classical mycology tests and *Histoplasma* urine antigen detection. *Open Forum Infect Dis* 6(4):ofz073.
- Freitas, D.F, Valle, A.C., da Silva, M.B., Campos, D.P, Lyra, M.R., de Souza, R.V., Veloso, V.G, Zancopé-Oliveira, R.M., Inácio-Bastos, F, Galhardo, M.C.G. 2014. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 8:3110.

- Galgiani, J.N., Ampel, N.M., Blair, J.E., Catanzaro, A., Johnson, R.H., Stevens, D.A., Williams, P.L., Infectious Diseases Society of America. 2005. Coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* 41(9):1217-1223.
- Galgiani, J.N., Ampel, N.M., Blair, J.E., Catanzaro, A., Geertsma, F., Hoover, S.E., Johnson, R.H., Kusne, S., Lisse, J., MacDonald, J.D., Meyerson, S.L., Raksin, P.B., Siever, J., Stevens, D.A., Sunenshine, R., Theodore, N. 2016. Executive Summary: 2016 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical practice guideline for the treatment of coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* 63(6):717-722.
- Giacomazzi, J., Baethgen, L., Carneiro, L.C., Millington, M.A., Denning, D.W., Colombo, A.L., Pasqualotto, A.C., Association with The LIFE Program. 2016. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses* 59(3):145-150.
- Gomes, O.M., Serrano, R.R.P., Pradel, H.O.V., Moraes, N.L.T.B., Varella, A.L.B., Fiorelli, A.I., Espósito, I., Saad, F.A., Furlaneto, J.A., Rothman, A., Espósito, M.A. 1978. Coccidioidomicose pulmonar. Primeiro caso nacional. *Rev Ass Med Bras* 24:167-168.
- Griffiths, J., Lopes Colombo, A., Denning, D.W. 2019. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5):0007195.
- Kirkland, T. N. 2016. The quest for a vaccine against coccidioidomycosis: a neglected disease of the Americas. *J Fungi (Basel)*, 2(4): pii: E34.
- Kollath, D.R., Miller, K.J., Barker, B.M. 2019. The mysterious desert dwellers: *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*, causative fungal agents of coccidioidomycosis. *Virulence* 10(1): 222-233.
- Kuhl, I.A., Kuhl, G., Londero, A., Diógenes, M.J.N., Ferreira, M.F. 1996. Coccidioidomycosis laríngea: relato de caso. *Rev Bras Otorrinolaringol* 62:48-52.
- Laniado-Laborín, R., Arathoon, E.G., Canteros, C., Muñoz-Salazar, R., Rendon, A. 2019. Coccidioidomycosis in Latin America. *Med Mycol* 57 (Supplement.1): S46-S55.
- Lauer A. 2017. Coccidioidomycosis: Increasing incidence of an “orphan” disease in response to environmental changes. In: Hurst C. (eds) *Modeling the Transmission and Prevention of Infectious Disease. Advances in Environmental Microbiology*, vol 4. Springer, Cham.
- Martins, M.A., Araújo, E.M.P.A., Kuwakino, M.H., Heins-Vaccari, E.M., Del Negro, G.M.B., Voza Jr., J.A., Lacaz. C.S. 1997. Coccidioidomycosis in Brazil. A case report. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 30:299-304.
- Martins-Melo, F.R., Ramos Jr, A.N., Alencar, C.H., Heukelbach, J. 2016. Trends and spatial patterns of mortality related to neglected tropical diseases in Brazil. *Parasit Epidemiol Contr* 1(2):56-65.
- MS, Ministério da Saúde. 2011. Proposta de vigilância epidemiológica e controle da coccidioidomicose. Brasília, 1-18.
- MS, Ministério da Saúde. 2010. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Pública* 44(1):200-202.
- Molloy, S.F., Chiller, T., Greene, G.S., Burry, J., Govender, N.P., Kanyama, C., Mfinanga, S., Lesikari, S., Mapoure, Y.N., Kouanfack, C., Sini, V., Temfack, E., Boulware, D.R., Dromer, F., Denning, D.W., Day, J., Stone, N.R.H., Bicanic, T., Jarvis, J.N., Lortholary, O., Harrison, T.S., Jaffar, S., Loyse, A. 2017. Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? *PLoS Negl Trop Dis* 11(6):e0005575.
- Moraes, M.A.P., Martins, R.L.M., Leal, I.I.R., Rocha, I.S.R., Medeiros Junior, P. M. 1998. Coccidioidomicose: novo caso brasileiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 31(6):559-562.
- Pappagianis D 1998. *Coccidioides immitis*. In Ajello L, Hay R (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed. Vol. 4 Medical Mycology, Arnold, London, p. 357-371.
- Queiroz-Telles, F., Fahal, A.H., Falci, D.R., Caceres, D.H., Chiller, T., Pasqualotto, A.C. 2017. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis*, 17(11):367-377.
- Rodrigues, M.L. 2018. Neglected disease, neglected populations: the fight against *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113 (7):180111.
- Sidrim, J.J.C., Silva, L.C.L., Nunes, J.M.A., Rocha, M.F.G., Paixão, G.C. 1997. Le Nord-Est Brésilien; Région d'endémie de coccidioidomicose? A propos d'une micro-épidémie. *J Mycol Med* 7:37-39.
- Silva, L.C.L., Nunes, L.M.A., Sidrim, J.J.C., Rios-Gonçalves, A.J. 1997. Coccidioidomicose pulmonar aguda. Primeiro surto epidêmico descrito no Ceará. Segundo no Brasil. *J Bras Med* 72:49-66.

- Sondermeyer, G., Lee, L., Gilliss, D., Tabnak, F.; Vugia, D. 2013. Coccidioidomycosis-associated hospitalizations, California, 2000-2011. *Emerg Infect Dis* 19(10): 1590-1597.
- The neglected histoplasmosis in Latin America Group. 2016. Disseminated histoplasmosis in Central and South America, the invisible elephant: the lethal blind spot of international health organizations. *AIDS*, 30: 167-170.
- Vianna, H., Passos, H.V., Sant'ana, A.V. 1979. Coccidioidomicose. Relato do primeiro caso ocorrido em nativo do Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 21:51-55.
- Wanke, B. 1994. Coccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 27 (supl. IV):375-378.
- Wanke, B., Lazera, M., Monteiro, P.C., Lima, F.C., Leal, M.J., Ferreira Filho, P.L., Kaufman, L., Pinner, R.W., Ajello, L. 1999. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathologia* 148(2):57-67.
- WHO, 2017. Report of the Tenth Meeting of the WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/NTD_STAG_report_2017.pdf>.

Molecular epidemiology and experimental sporotrichosis: challenges and perspectives

CORRÊA-MOREIRA, Danielly^{1,2}; BORBA, Cintia de Moraes²; BARREIRA, Thais Guimarães³;
MENEZES, Rodrigo Caldas¹; GREMIÃO, Isabella Dib¹; PEREIRA, Sandro Antonio¹;
OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista¹

¹ Pesquisadores, Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos – INI/FIOCRUZ

² Pesquisadoras, Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos /IOC/FIOCRUZ

³ Doutoranda, Plataforma de Laboratório Multiusuário / INI/FIOCRUZ

Email: danielly.correa@ini.fiocruz.br; cborba@ioc.fiocruz.br; thais.guimaraes@ini.fiocruz.br; isabella.dib@ini.fiocruz.br; sandro.pereira@ini.fiocruz.br; manael.marques@fiocruz.br

Abstract

Sporotrichosis is the main subcutaneous mycosis in Brazil, caused by pathogenic dimorphic fungi of the *Sporothrix* complex, which infect humans and other animal species, especially cats. There has been a high number of cases in the state of Rio de Janeiro, Brazil, since 1998 which is considered the largest ongoing zoonotic transmission epidemic in the world. From 1998 to 2017 were diagnosed at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI)/Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) 4,916 feline and 244 canine cases. In addition, over 5000 human cases were diagnosed at INI between 1997 and 2015. The standard reference test for the diagnosis of sporotrichosis is based on isolation and identification of *Sporothrix* spp. in clinical specimens, but is not always possible, especially in cases of unusual manifestations of infection. Recently, based on the phenotypic and genotypic characteristics studies, was proposed *Sporothrix* complex which encompasses 7 cryptic species: *Sporothrix schenckii stricto sensu*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriei*, *S. pallida* and *S. chilensis*. However, these characteristics may vary among species, making fundamental the correlation between molecular data and phenotypic characteristics in the identification of *Sporothrix* complex species, which highlights the importance of polyphasic taxonomy. Additionally, we reinforce the value of the experimental studies of the virulence among species, so that we can understand the different biological behaviors of species that infect mammalian hosts and hereafter, the immune response of these hosts to the infection with *Sporothrix* complex species.

Keywords: *Sporothrix*, Polyphasic taxonomy, Experimental model, Virulence, Compulsory notification.

1. Introduction

Sporotrichosis is the most common subcutaneous mycoses in Brazil caused by thermodimorphic pathogenic fungi of the genus *Sporothrix* that infects humans and animals, mainly felines (Lopes-Bezerra *et al.*, 2018; Gremião *et al.*, 2017).

Infection generally occurs after traumatic inoculation of fungus found in soil, plants, and organic matter into skin or mucosa. Another form of infection includes the zoonotic transmission, which has been associated with scratches or bites from animals, especially cats (Barros *et al.*, 2011).

The first epidemic of zoonotic sporotrichosis related to cats was identified in Rio de Janeiro State, Brazil, in 1998 (Gremião *et al.*, 2017) and *Sporothrix brasiliensis* has been the most prevalent etiological agent, but other species also circulate in minor proportions (Rodrigues *et al.*, 2013; Almeida-Paes *et al.*, 2014).

In humans, the lymphocutaneous form is the most frequent clinical presentation followed by the cutaneous fixed form. However, unusual manifestations, including disseminated and severe disease leading to death, might occur (Almeida-Paes *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2014).

In Rio de Janeiro, sporotrichosis affects a large at-risk population, which includes HIV-infected patients, constituting the largest case series of co-infection sporotrichosis-HIV reported to date (Freitas *et al.*, 2010;

Freitas *et al.*, 2014). Disseminated cases in non-immunosuppressed patients have been more common than previously reported for other regions, which is likely associated with the multiple scratches from the diseased cats and a greater virulence of *S. brasiliensis* (Freitas *et al.*, 2015).

The clinical manifestations of feline sporotrichosis range from a single skin lesion that can progress to multiple lesions and even fatal systemic involvement. A higher occurrence is found in adult male, mongrel and unneutered cats. Nodules and ulcers are the most common lesions, and respiratory signs and mucosa involvement are frequently described (Gremião *et al.*, 2015). The majority of the cats become infected after fights and/or contact with other diseased cats (Schubach *et al.*, 2004). Generally, different from the classical route of infection, transmission of *Sporothrix* spp. among cats occurs via direct inoculation of yeast cells, which are more virulent than the mycelial form and represents a successful type of dispersal of the disease (Rodrigues *et al.*, 2013), including zoonotic transmission.

In contrast to the high frequency of feline sporotrichosis cases in Brazil, especially in Rio de Janeiro, this mycosis sporadically affects dogs. These animals usually develop less severe clinical forms than cats, often with clinical signs similar to those of other infectious diseases (Madrid *et al.*, 2012). Dogs are infected by traumatic inoculation of *Sporothrix* in colonized material due to their soil-digging habits, as well as by scratching or biting by infected cats (Guterres *et al.*, 2014).

2. Etiologic agent

Sporothrix schenckii sensu lato is an ascomycetous dimorphic organism (Ascomycota, Pyrenomycetes, Ophiostomatales, Ophiostomataceae) that is found in substrates like living and decaying vegetation, animal excreta, and soil (de Beer *et al.*, 2016). This fungus is phenotypically characterized by the ability to produce sessile dematiaceous conidia, in most species, along with hyaline sympodial conidia in its filamentous form, and cigar-shaped yeast-like cells in parasitism or when cultured at 35-37°C on specific culture media (Marimon *et al.* 2007). Until 2007, this species was recognized as the sole agent of sporotrichosis (Lopes-Bezerra *et al.* 2006). Recently, de Beer and colleagues (2016) reported that the 51 fungal species included in the genus *Sporothrix* can be grouped in at least five well-supported “species complexes” and a “pathogenic clade” containing the species (*Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* and *Sporothrix luriei*) (de Beer *et al.*, 2016) associated to cases of sporotrichosis in the world (Chakrabarti *et al.*, 2015).

Among the pathogenic species in the genus *Sporothrix*, *Sporothrix pallida* (formerly *S. albicans*), *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix chilensis* and *Sporothrix stenoceras*, are considered occasional opportunists, and these species are found in other lineages of this genus, but not considered as primary pathogens (de Beer *et al.*, 2016).

3. Molecular epidemiology of sporotrichosis in Brazil and compulsory notification

Human and animal sporotrichosis was subject to compulsory notification only in some states or municipalities of Brazil, and because of this its real occurrence have been underestimated. In addition, it is underdiagnosed in humans and cats and dogs.

High rates of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* have been reported in Rio de Janeiro since 1998. Nowadays, this state is a hyperendemic area of sporotrichosis (Gremião *et al.*, 2017). In the period of 1998 to 2017, 4,916 feline and 244 canine cases of sporotrichosis were diagnosed at the National Institute of Infectious Diseases (INI/FIOCRUZ) (Figueiredo *et al.*, 2017; Gremião *et al.*, 2017). Furthermore, more than 5.000 humans' cases of sporotrichosis were diagnosed in the period of 1997 to 2015 (Falcão, 2018).

Rio de Janeiro was the first state where human and animal sporotrichosis have become a notifiable disease (2013 and 2014, respectively). Even with the geographical expansion of the disease to several states of Brazil, compulsory notification has been made in the states of Rio Grande do Norte and Pernambuco, in addition to the municipalities of Guarulhos (state of São Paulo), Conselheiro Lafaiete and Belo Horizonte (state of Minas Gerais), Salvador (state of Bahia) and João Pessoa (state of Paraíba). A map of occurrence and notification of humans and/or animal cases in Brazil was constructed based on the review of studies in literature (Gremião *et al.*, 2017; Falcão *et al.*, 2018) (Figure 1).

Human cases of sporotrichosis in our country were caused by *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, and *S. schenckii* (Almeida Paes *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2012; Montenegro *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2013; Oliveira MM *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2011; Madrid *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010). However, *S. brasiliensis* is the prevalent etiological agent of sporotrichosis in Brazil in humans and felines cases (Oliveira *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013; Boechat *et al.*, 2018). The occurrence of *S. brasiliensis* in cats was described in all the states in the southeastern region of Brazil, Rio de Janeiro (Boechat *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018; Macêdo-Sales *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2013), São Paulo (Montenegro *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2013), Minas Gerais (Rodrigues *et al.*, 2013) and Espírito Santo (Araújo *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2013). *S. albicans* and *S. schenckii* were isolated from cats with sporotrichosis (Rodrigues *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2011), while *S. luriei* was isolated from a dog in Rio Grande do Sul (Oliveira *et al.*, 2011).



Figure 1. Occurrence and notification of humans and/or animal cases of sporotrichosis in Brazil.

4. Diagnosis of sporotrichosis

The diagnosis of sporotrichosis in humans and animals is supported by association of epidemiological data, clinical signs, patient's history and laboratorial exams. However, up to now the fungal culture is reference standard for diagnosis from clinical specimens obtained of lesions like pus, secretions or fragment of skin or mucosal lesions (Pereira *et al.*, 2015). Unlike cats (high fungal load in the lesions), the best results for fungal isolation in dogs are obtained from skin biopsy samples (Schubach *et al.*, 2006) (Table 1). Demonstration of thermodimorphism is essential to confirm the diagnosis. Molecular tools are required for the recognition of cryptic species (Oliveira 2011, Rodrigues *et al.*, 2016).

It is essential the early diagnosis of feline sporotrichosis, to guarantee that the appropriate prevention measures will be employed for owners, especially those in a higher risk, such as immunosuppressed people. Moreover, the treatment should be started promptly, since it generally induces a rapid decrease of fungal load, suggesting a reduction in the risk of zoonotic transmission of *Sporothrix* (Miranda *et al.*, 2018).

Table 1. Diagnosis of sporotrichosis

Clinical specimens	Direct MYCOLOGICAL (KOH)	CYTOLOGY GROCOTT/PAS/Quick Panoptic	Fungal Culture
Humans	Low sensitive for the diagnosis / Difficult direct examinations	Low fungal load in the lesions Difficult direct examinations	Reference standard Problem obtained positive culture--> disseminated cases
Felines	High fungal load in the lesions / Favoring direct examination	Cytologic examination--> preliminary diagnosis High sensitivity (79 to 85%)	Reference standard Swab specimen's similar sensitivity compared to skin biopsy
Canines	Low sensitive for the diagnosis / Difficult direct examinations	Low fungal load in the lesions Low sensitivity (32%)	Reference standard Problem obtained positive culture--> fungal load is usually low

5. Virulence profile of pathogenics species of *Sporothrix* genus and experimental models

The study of infectious diseases requires the use of adequate host to reproduce in vivo infection (Brunke *et al.*, 2015). In selecting a specific vertebrate model of fungal infection relates, the choice of host, the fungal strain used for inoculation, the inoculum size and the route of administration represent critical variables for experimental outcomes (Hohl, 2014). Mammals, especially rodents, have been served as basis for several researches in recent decades. However, it has been observed an increase of the studies involving pathogenic fungi, with the use of alternative experimental models such as the vertebrate *Danio rerio* - zebrafish (Chao *et al.*, 2010; Tobin *et al.*, 2012), non-parasitic nematode *Caenorhabditis elegans* (Breger *et al.*, 2007), and the insects *Galleria mellonella* (Cotter *et al.*, 2000; Jacobsen, 2014) and *Drosophila melanogaster* (Glittenberg *et al.*, 2011; Limmer *et al.*, 2011).

Notwithstanding, the use of experimental non-mammalian models keep controversial, because it is not known how well they are capable of predicting the potential for virulence of pathogens in humans or other mammals (Brunke *et al.*, 2015). Also, there are some tips associated with these systems. First and foremost, the body temperature of non-mammalian hosts is generally lower than in humans. Since many microbial virulence factors are expressed in human body temperature, this difference constitutes an important obstacle to the use of alternative models (Brunke *et al.*, 2015). Thus, laboratory mice represent the host species of choice for most questions related to mycologic infections.

As mentioned earlier, *Sporothrix* dimorphism is a virulence factor directly related to the ability of the fungus to survive and acquire parasitic form at host body temperature. Since the 1940s, experimental *Sporothrix* infection in a mammalian model has been reported predominantly in several mouse strains. Most of these studies describe intraperitoneal, intravenous and especially subcutaneous as the preferred routes of inoculation, as this is the classic form of sporotrichosis transmission. Few studies describe inhalation, intratracheal and intrathoracic as routes of infection. It is noteworthy that, only from the 2000s, studies were started with the species belonging to the *Sporothrix* complex. (Table 2). Previous studies in murine model suggested *S. brasiliensis* is the most pathogenic species of *Sporothrix* genus (Arrillaga-Moncrieff *et al.*, 2009). However, a study using patients with local and invasive forms of sporotrichosis caused by *S. brasiliensis* and *S. schenckii* in hyperendemic area of Rio de Janeiro, regardless the clinical form, there was a trend toward shorter treatment durations in patients with sporotrichosis caused by *S. brasiliensis*, than the cases due to *S. schenckii* (Almeida-Paes *et al.*, 2014).

Despite the variety of the studies mentioned above, using experimental models of *Sporothrix* infection, none of them describe the infection simultaneously with the seven species of the *Sporothrix* complex in immunocompetent mice, with the objective of drawing a panel indicating the degree of virulence of each species. Similarly, there are no studies demonstrating the inoculation of *S. schenckii stricto sensu* and *S. brasiliensis* species, the most frequent in the largest sporotrichosis epidemic in the world, which occurs in Rio de Janeiro, in a chemically immunosuppressed murine model, since this condition mimics the immunological status of patients undergoing the most invasive forms of sporotrichosis.

In this sense and as perspective to improve the understanding of this mycosis, our group has been developing studies (data not yet published) that aim to evaluate differences in virulence profile among the seven species of the complex, identified by polyphasic taxonomy, inoculated in an immunocompetent murine model. Since several

characteristics may vary among species, is fundamental the correlation between molecular data and phenotypic characteristics in the identification of species of the *Sporothrix* complex. Additionally, considering the epidemiological importance of *S. schenckii stricto sensu* and *S. brasiliensis* species and the sporotrichosis as a primary marker of HIV infection (Freitas *et al.*, 2012), we have also been used immunosuppressed murine model infected with these two species. In parallel to the virulence studies, we phenotypically evaluated the cells involved in the immune response against fungal infection. Among our perspectives is the functional characterization of these cells, in order to elucidate mechanisms of the immune response and the potential use of cytokines as a marked disease prognosis that can be used in the prevention or treatment of fungal infections. Thus, we also reinforce the value of the experimental studies of the virulence among species, so that we can understand the different biological behaviors of species that infect mammalian hosts and hereafter, the immune response of these hosts to the infection with *Sporothrix* complex species.

Consideration should always be given trying to reduce the number of animals per experimental procedure in a study, replace animal use when possible, and refine methods already described to minimize animal discomfort are imperative. Thus, the constant challenge of animal experimentation is the search for a cheap model, easy to handle and maintain, and especially that allows the evaluation of biological phenomena that can be compared to the course of the disease in question.

Table 2. Review of *Sporothrix* spp. experimental infection in mammalian models

Species	Decade	Authors	Model	Inoculation route
<i>Sporothrix schenckii</i> s.l. <i>S. S</i> var. <i>luriei</i>	1940-1960	Backer (1947); Shintani J. <i>et al.</i> (1956); Norden (1957); Hasenclever <i>et al.</i> (1959); Howard and Orr (1963); Mackinnon <i>et al.</i> (1964); Sethi and Shwarz (1965); Sethi (1966); Beland <i>et al.</i> (1968); Conti-Diaz and Civila (1969); Ajello and Kaplan (1969)	Mice: Swiss, Rockefeller Rabbit, Guinea Pig	SC, i.p., i.v., inh.
<i>S. schenckii</i> s.l. <i>S. cyanenses</i>	1970- 1990	Roberts and Larsh (1970); Sethi (1972); Block <i>et al.</i> (1973); Blumer <i>et al.</i> (1973); Charoenvit and Taylos (1979); Kwon-Chung (1979), Hachisuka and Sasai (1980, 1981); Dickerson <i>et al.</i> (1983); Kobayashi and Ishizaki (1984); Kazanas (1986); Miyagi and Nishimura (1986); Schauda and Meingassner (1986); Kutsen <i>et al.</i> (1987); Kan and Bennett (1988); Shimizu <i>et al.</i> (1989); Sigler <i>et al.</i> (1990); Dixon <i>et al.</i> (1992); Shiraishi <i>et al.</i> (1992); Capriles <i>et al.</i> (1993); Lei <i>et al.</i> (1993); Yoshiike <i>et al.</i> (1993); Carlos <i>et al.</i> (1993; 1999); Tachibana <i>et al.</i> (1998; 1999).	Guinea pig, Rabbit, Hamster Mice: Nude, Swiss, CF ₁ , NMRI, BALB/c, ICR, NYLAR, C3H,	SC, i.p., i.v. i.t.
<i>S. schenckii</i> s.l. <i>S. schenckii</i> s.s. <i>S. brasiliensis</i> ; <i>S. globosa</i> ; <i>S. pallida</i> (formerly) <i>S. albicans</i> <i>S. mexicana</i>	2000-2019	Fernandes <i>et al.</i> (2000; 2008); Da Silva <i>et al.</i> (2001); Lima <i>et al.</i> (2003); Hu <i>et al.</i> (2003); Kajiwara <i>et al.</i> (2004); Brito <i>et al.</i> (2004; 2011); Nascimento and Almeida (2005); Nobre <i>et al.</i> (2005); Kong <i>et al.</i> (2006); Maia <i>et al.</i> (2006); Meinerz <i>et al.</i> (2008); Antunes <i>et al.</i> (2009); Carlos <i>et al.</i> (2009); Teixeira <i>et al.</i> (2009); Arrillaga-Moncrieff <i>et al.</i> (2009); Sassá, MF. <i>et al.</i> (2009); Teixeira, PAC. <i>et al.</i> (2010); Xu, t. <i>et al.</i> (2010); Madri, IM. <i>et al.</i> (2010); Franco <i>et al.</i> (2011); Zhang <i>et al.</i> (2011); Lacerda <i>et al.</i> (2011); Fernandez-Silva <i>et al.</i> (2012); Castro <i>et al.</i> (2012); Mendoza <i>et al.</i> (2012); Romo-Lozano <i>et al.</i> (2012); Verdan <i>et al.</i> (2012); Negrini <i>et al.</i> (2012; 2014); Fernandes <i>et al.</i> (2013); Alegranci <i>et al.</i> (2013); Castro <i>et al.</i> (2013); Rodrigues <i>et al.</i> (2014); De Almeida <i>et al.</i> (2015; 2017a, b); Almeida-Paes <i>et al.</i> (2015); Ferreira <i>et al.</i> (2015); Flores-Garcia <i>et al.</i> (2015); Gonçalves <i>et al.</i> (2015); Rodrigues <i>et al.</i> (2015; 2016); Ishida <i>et al.</i> (2015); Mario <i>et al.</i> (2015); Cruz-Choappa <i>et al.</i> (2016); Huang <i>et al.</i> (2016); Castro <i>et al.</i> (2016); Alba-Fierro <i>et al.</i> (2016); Portuondo <i>et al.</i> (2016); Castro <i>et al.</i> (2017); Oliveira <i>et al.</i> (2017); Della Terra <i>et al.</i> (2017); Gonçalves <i>et al.</i> (2017); Cheng <i>et al.</i> (2017); Burian <i>et al.</i> (2017); Batista-Duharte <i>et al.</i> (2017; 2018); Manente <i>et al.</i> (2017); Jellmayer <i>et al.</i> (2017); Manente <i>et al.</i> (2018); Rossato. <i>et al.</i> (2018a, b; 2019); Ishida <i>et al.</i> (2018)	Mice: C57Bl/6, TS-TR/Ab/HETS, BALB/c, ICR, Swiss, OF-1, CF ₁ , Kunming, Wistar Rat Hamster/ Mongolian Gerbil,	SC, i.p., i.v., i.t.c.

i.v. – Intravenous route; i.p. – Intraperitoneal route; i.t. Intrathoracic route; inh. – Inhalatory route; i.t.c – Intratracheal route; SC – subcutaneous route; *S. schenckii* s.l. – *Sporothrix schenckii* sensu lato; *S. schenckii* s.s – *Sporothrix schenckii* stricto sensu; *S.s* var. *luriei* – *Sporothrix schenckii* var. *luriei*

6. Conclusions

Zoonotic transmission of *S. brasiliensis* in Rio de Janeiro and the increasing number of cases of the disease in Brazil represent a challenge for researchers and health professionals. We believe that the compulsory notification should be mandatory in all states of Brazil, since this information could be used to investigate cases that could prevent the spread of further human and animal cases, to assess the effects of public health interventions, as well as, to facilitate the early identification of outbreaks.

We further believe that it is necessary to accurately identify the new circulating species of *Sporothrix* sp., and to this aim we emphasize the use of polyphasic taxonomy. In addition, it is essential to better understand their biological behavior and thus we reinforce the importance of using experimental models that reproduce the interaction of the fungus with mammalian host.

7. References

- Almeida-Paes R., de Oliveira M.M., Freitas D.F., do Valle A.C., Zancopé-Oliveira R.M., Gutierrez-Galhardo M.C. 2014. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(9):e3094.
- Araujo M.L., Rodrigues A.M., Fernandes G.F., de Camargo Z.P., de Hoog G.S. 2015. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. *Mycoses.* 58(8):485-90
- Arrillaga-Moncrieff, J., Capilla, E., Mayayao, R., Marimon, R., Marine, J., Gené, J., Cano, J., Guarro, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 15: 651–655.
- Barros M.B., de Almeida Paes R., Schubach A.O. 2011. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 24(4):633-54.
- Boechat J.S., Oliveira M.M.E., Almeida-Paes R., Gremião I.D.F., Machado A.C.S., Oliveira R.V.C., Figueiredo A.B.F, Rabello V.B.S., Silva K.B.L., Zancopé-Oliveira R.M., Schubach T.M.P., Pereira S.A. 2018. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 113(3):185-196.
- Breger, J., Fuchs, B.B., Aperis, G., Moy, T.I., Ausubel, F.M., Mylonakis, E. 2007. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog.* 3:18.
- Brunke, S., Quintins, J., Kasper, L., Jacobsen, I.D., Richter, M.E., Hiller, E., 2015. Of mice, flies – and men? Comparing fungal infection models for large scale screening efforts. *Dis Mod Mech.* 8: 473-486.
- Chakrabarti A., Bonifaz A., Gutierrez-Galhardo M.C., Mochizuki T., Li S. 2015. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol* 53(1):3-14.
- Chao, C.C, Hsu, P.C., Jen, C.F., Chen, I.H., Wang, C.H., Chan, H.C. 2010. Zebrafish as a model host for *Candida albicans* infection. *Infect. Immun.* 78:2512-2521.
- Cotter, G., Doyle, S., Kavanagh, K. 2000. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27:163-169.
- de Beer Z.W., Duong T.A., Wingfield M.J. 2016. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. *Stud Mycol* 83:165-191.
- Falcão E.M.M., de Lima Filho J.B., Campos D.P., Valle A.C.F.D., Bastos F.I., Gutierrez-Galhardo M.C., Freitas D.F.S. 2019. Hospitalizations and deaths related to sporotrichosis in Brazil (1992-2015). *Cad Saude Publica.* 2;35(4): 00109218.
- Freitas D.F., do Valle A.C., Almeida-Paes R., Bastos F.I., Galhardo M.C. 2010. Zoonotic Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis.* 1;50(3):453.
- Freitas D.F., Santos S.S., Almeida-Paes R., de Oliveira M.M., do Valle A.C., Gutierrez-Galhardo M.C. 2015 Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. *Virulence.* 6(2):112-20.

- Freitas D.F., Valle A.C., da Silva M.B., Campos D.P., Lyra M.R., de Souza R.V., 2014. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(8):3110.
- Glittenberg, M.T., Silas, S., Maccallum, D.M., Gow, N.A.R., Ligoxygakis, P. 2011. Wild-type *Drosophila melanogaster* as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*. *Dis. Model. Mech*. 4: 504-514.
- Gremião I.D., Menezes R.C., Schubach T.M., Figueiredo A.B., Cavalcanti M.C., Pereira S.A. 2015. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol*. 53(1):15-21.
- Gremião I.D., Miranda L.H., Reis E.G., Rodrigues A.M., Pereira S.A. 2017. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog*. 19;13 (1):1006077.
- Guterres, K.A., de Matos, C.B., Osório, L.G., Schuch, I.D., Cleff, M.B. 2014 The Use of (1–3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. *Mycopath*. 177: 217-221.
- Hohl, T.M. 2014. Overview of Vertebrate Animal Models of Fungal Infection. *J Immunol Methods*. 0: 100–112. doi:10.1016/j.im.2014.03.022.
- Jacobsen, I.D. 2014. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*. 5: 237-239.
- Limmer, S., Quintin, J., Hetru, C., Ferrandon, D. Limmer, S., Quintin, J., Hetru, C. And Ferrandon, D. 2011. Virulence on the fly: *Drosophila melanogaster* as a model genetic organism to decipher host-pathogen interactions. *Curr. Drug Targets*. 12:978-999.
- Lopes-Bezerra L.M., Schubach A.O., Costa R.O. 2006 *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc* 78:293-308.
- Lopes-Bezerra L.M., Mora-Montes H.M., Zhang Y., Nino-Vega G., Rodrigues A.M., de Camargo Z.P. 2018. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Med Mycol*. 1;56 (1):126-143.
- Madrid I.M., Mattei A., Martins A., Nobre M., Meireles M. 2010. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoon Pub Health*. 57(2):151–4.
- Madrid I.M., Mattei A.S., Fernandes C.G., Nobre M.de O., Meireles M.C. 2012. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopath*. 173(4):265-73.
- Marimon R., Cano J., Gene J. 2007 *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J. Clin Microbiol* 45:3198-3206.
- Miranda L.H.M., Silva J.N., Gremião I.D.F., Menezes R.C., Almeida-Paes R., Dos Reis E.G. 2018. Monitoring Fungal Burden and Viability of *Sporothrix* spp. in Skin Lesions of Cats for Predicting Antifungal Treatment Response. *J. Fungi (Basel)*. 7;4(3).
- Montenegro H., Rodrigues A.M., Dias M.A., da Silva E.A., Bernardi F., de Camargo Z.P. 2014. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in Sao Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 10:269.
- Oliveira D.C., Lopes P.G., Spader T.B., Mahl C.D., Tronco-Alves G.R., Lara V.M., Santurio J.M., Alves S.H. 2011. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol*. 49(8):3047-9. doi: 10.1128/JCM.00255-11. Epub 2011 Jun 8.b.
- Oliveira M.M., Maifrede S.B., Ribeiro M.A., Zancope-Oliveira R.M. 2013. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108(7):936–8.
- Oliveira M.M.E., Almeida-Paes R., Muniz M.M. 2011. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopath*. 172:257-267.
- Oliveira M.M.E., Almeida-Paes R., Muniz M.M., Lima-Barros M.B., Galhardo M.C., Zancope-Oliveira R.M. 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: case report. *Mycopath*. 169(5):359-363.
- Oliveira M.M.E., Pereira S.A., Gremião I.D.F., Menezes R.C. 2015. Sporotrichosis in Animals: Zoonotic Transmission. In: Carlos IZ, ed. Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects: Springer International Publishing p.83-102.
- Rodrigues A.M., de Hoog G., Zhang Y., Camargo Z.P. 2014. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant species. *Emerg Microbes Infect*. 3(5). e32.

- Rodrigues A.M., de Hoog G.S., Camargo Z.P. 2013. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol* 51:405-412.
- Rodrigues A.M., de Melo Teixeira M., de Hoog G.S., Schubach T.M., Pereira S.A., Fernandes G.F. 2013. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(6):2281.
- Schubach T.M., Schubach A., Okamoto T., Barros M.B., Figueiredo F.B., Cuzzi T. 2004. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc*. 15;224(10):1623-9.
- Schubach T.M.P.; Schubach A.; Okamoto T. 2006. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol* 44: 87-92.
- Tobin, D.M., May, R.C., Wheeler, R.T. 2012. Zebrafish: a see-through host and a fluorescent toolbox to probe host-pathogen interaction. *PLoS Pathog*. 8: e1002349, 2012.

Fungos de um nicho ancestral: fungos fitopatogênicos em pteridófitas no Brasil

GUATIMOSIM, Eduardo¹; BARRETO, Robert Weingart²; SCHWARTSBURD, Pedro Bond²

¹ Universidade Federal do Rio Grande

² Universidade Federal de Viçosa

Emails: e.guatomosim@furg.br, rbarreto@ufv.br, pedro.schw@ufv.br.

Resumo

Um estudo sistemático de fungos fitopatogênicos relacionados a plantas da divisão *Pteridophyta* no Brasil foi realizado. Plantas desta divisão, comumente conhecidas como samambaias, têm ligações evolutivas diretas com as primeiras plantas vasculares que apareceram no final do período Devoniano. Espécimes oriundos de diferentes biomas brasileiros, durante sete anos de estudo, foram coletados. O total de 180 isolados fúngicos, recuperados de 140 espécies de plantas hospedeiras em 135 diferentes localidades resultaram na descrição de 23 novas espécies, a saber *Bloxamia cyatheicola*, *Cercospora samambaiiae*, *Clypeosphaerella sticheri*, *Inocyclus angularis*, *Lachnopsis catarinensis*, *L. dicksoniae*, *Neoceratosperma alsophilae*, *N. cyatheae*, *Paramycosphaerella blechni*, *P. cyatheae*, *P. dicranopteridis-flexuosae*, *P. sticheri*, *Phaeophleospora pteridivora*, *Pseudocercospora brackenicola*, *P. paranaensis*, *P. serpocaulonicola*, *P. trichogena*, *Rhagadolobiosis thelypteridis*, *Scolecocladium pteridii*, *Xenomycosphaerella diplazii*, *Zasmidium cyatheae*, *Zymochalara cyatheae*, e *Z. lygodii*, incluído nestas, cinco novos gêneros. Os trabalhos resultaram ainda na proposição de 13 novas combinações; 11 novas associações fungo-hospedeiro, além da epitipificação da espécie *Caliciopsis maxima*, que possibilitou seu posicionamento filogenético. O presente trabalho permite uma melhor compreensão da biodiversidade de microfungos relacionada a plantas da divisão *Pteridophyta* no Brasil.

Palavras-chave: Biodiversidade, Cercosporoides, Neotrópicos, Parmulariaceae, Samambaias tropicais.

1. Introdução

O desafio de se estimar o tamanho da diversidade da micobiota mundial foi abordado pela primeira vez no trabalho pioneiro de Hawksworth (1991). Desde então, vários trabalhos têm lidado com estimativas do número de fungos existentes no mundo (Hawksworth e Rossman, 1997; Hyde, 2001; Hawksworth, 2001; 2004, Bass e Richards, 2011; Blackwell, 2011; Fisher *et al.*, 2012). Seja qual for o tamanho desta diversidade, desafio maior está em descrever as espécies de fungos antes que as alterações globais impostas pela atividade humana levem-nas à extinção. Estratégias e metodologias de coleta e descrição de fungos desconhecidos para a ciência foram desenvolvidas e livros inteiros foram dedicados a este tema, como exemplo Mueller *et al.* (2004). Uma estratégia para a expansão do conhecimento sobre os fungos existentes é a de se estudar a micobiota associada a espécies de plantas selecionadas (Alves *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2010) ou a grupos de plantas para as quais a micobiota é ainda pouco conhecida. Um desses grupos é composto pelas espécies brasileiras de pteridófitas, objeto deste estudo.

Na classificação de Smith *et al.* (2006), a Divisão Pteridophyta, excluindo-se as Licófitas (Lycopodiophyta), representa um grupo incluindo 38 famílias, aproximadamente 300 gêneros e mais de 9.000 espécies. No Brasil, existem cerca de 1.360 espécies conhecidas, porém estima-se que existam ainda mais (Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2020). Duas espécies se destacam por serem consideradas plantas invasoras de importância mundial: *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (Dennstaedtiaceae), e *Salvinia molesta* D.S. Mitch. (Salviniaceae) (Holm *et al.*, 1996). Outra espécie de grande destaque no Brasil é *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), planta arborescente que no passado foi comum em áreas de Mata Atlântica e que, atualmente, encontra-se incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção da flora brasileira (Biondi *et al.*, 2009) devido à exploração excessiva para uso como substrato vegetal e fabricação de vasos.

No entanto, em sua grande maioria, espécies nativas pertencentes à divisão Pteridophyta têm pouca “visibilidade”, sendo desconhecidas do público e apenas referidas por nomes genéricos como samambaias, avencas e xaxins. Talvez por isso não tenham sido até hoje objeto de qualquer estudo sistemático por micologistas e fitopatologistas. É importante ressaltar que mesmo para a micobiota das espécies citadas como mais conhecidas, sabe-se muito pouco acerca dos fungos que a colonizam.

Dentre os reinos em que são classificados os organismos que compõem a biodiversidade global, os fungos representam uma porção geralmente negligenciada pela ciência. Estima-se que menos de 10% das espécies existentes é conhecida (Blackwell, 2011). A grande lacuna de conhecimento existente no campo da micologia representa um notável paradoxo quando se tem amplo reconhecimento de que os fungos desempenham papel fundamental na ecologia e manutenção dos ecossistemas (Dighton, 2003; Stamets, 2005). Sua função não está somente relacionada ao seu papel primordial no nível trófico dos decompositores – fundamentais para processos biogeoquímicos, como a ciclagem de nutrientes, vital para a manutenção e homeostase da biosfera (Grandi, 2004; Grandi e de Valois Silva, 2006), mas também ocupando grande diversidade de nichos ecológicos, mantendo relações de extrema relevância com plantas, animais e outros organismos, inclusive com outros fungos. No que tange a associação com as plantas, os fungos podem estabelecer relações simbióticas mutualísticas – como nas micorrizas, nas colonizações endofíticas e nos líquens; comensalistas – como nos epibiontes que ocorrem epifiticamente sobre plantas; ou ainda como parasitas como no caso dos fungos fitopatogênicos.

Em função das elevadas perdas impostas por fungos fitopatogênicos a plantas cultivadas, toda uma disciplina (Fitopatologia), foi construída desde meados do século XIX, com uma orientação fortemente pautada no entendimento de associações de fungos fitopatogênicos com plantas cultivadas. O estudo dos fungos fitopatogênicos teve então como foco os prejuízos causados por sua ação, e assim, tais organismos foram tratados como exclusivamente maléficos aos interesses humanos. Entretanto sob um olhar mais cauteloso e abrangente pode-se constatar que as injúrias provocadas pela ação dos fungos (doença) sobre determinada planta é um processo comum e natural e que, as devastadoras epidemias responsáveis pela perda de produção em ambientes agrícolas, é fruto da forma de agricultura baseada em monoculturas, escolhida pelo homem. Em busca da padronização do produto final, o atual modelo de agricultura lançou mão da uniformidade aplicada em todos seus termos: genética, ambiental, de tratamentos culturais, etc. Este ambiente uniforme, quando favorável a determinado patógeno, tem por consequência o desenvolvimento de doença em larga escala e consequentemente (caso nenhuma intervenção seja realizada) a perda significativa da produção.

Fungos fitopatogênicos inspiram, justificado temor, não só pelos vultosos prejuízos impostos à produção agrícola, mas também catástrofes ambientais impostas a espécies vegetais em ecossistemas naturais, resultantes geralmente da introdução de espécies fúngicas exóticas. Dentre alguns dos exemplos notáveis, podem ser citados a “doença de Jarrah” desencadeada pela introdução de *Phytophthora cinamomi* na Austrália; a destruição da castanheira norte americana por *Cryphonectria cubensis*; a “doença holandesa do olmo” na Europa e EUA causada por *Ophiostoma ulmi* (os dois últimos introduzidos a partir da Ásia) (Money, 2006); as recentes epidemias ora em progresso na Califórnia pelo avanço de *Phytophthora ramorum* originária da Europa (Rizzo *et al.*, 2002) e a mais recente destruição de freixos (*Franxinus excelsior*) na Inglaterra, ocasionada pelo fungo *Chalara fraxinea*, o qual destruiu mais de 100.000 indivíduos arbóreos de novembro de 2012 a janeiro de 2013 (BBC, 2019). Apesar da nocividade dos fungos fitopatogênicos permear a literatura fitopatológica, sua ampla maioria não tem qualquer relevância para a produção agrícola e florestal. Há inclusive espécies de fungos fitopatogênicos que são desejáveis, como é o caso dos fungos que vem sendo estudados ao longo dos últimos quarenta anos como agentes de controle biológico de plantas daninhas (Barreto *et al.*, 2012).

Nesta disciplina aproveita-se o papel dos fungos fitopatogênicos como biorreguladores de espécies de plantas em ecossistemas naturais. Seja por intermédio de introduções de tais fungos em situações onde a planta hospedeira (esta sim, indesejável por algum motivo) escapou de seus inimigos naturais, seja por manipulação visando a magnificação do impacto produzido pelo fungo, almeja-se a inversão da lógica usual, fazendo, pois, dos fungos fitopatogênicos, espécies benéficas. Além da revisão mais recente sobre o uso de fungos para o controle biológico de plantas daninhas (Barreto *et al.*, 2012) várias outras revisões completas foram publicadas sobre este tema, desde a primeira experiência prática efetuada no início dos anos de 1970 (Hasan, 1974; Huffaker, 1976; Hasan,

1980; Evans, 1987; Adams, 1988; Ayres e Paul, 1990; Evans e Ellison, 1990; Charudattan, 1991; Tebeest *et al.*, 1992; Hallett, 2005; Ghosheh, 2005).

O presente trabalho contempla o estudo de fungos associados a diferentes espécies da divisão Pteridophyta encontradas no Brasil, incluindo tanto a citada invasora de importância mundial *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, quanto *Dicksonia sellowiana*, espécie nativa ameaçada de extinção. Durante os levantamentos feitos na região sudeste e sul do Brasil por fungos associados às duas espécies-alvo principais, todas as oportunidades que se apresentaram de coleta de fungos associados a pteridófitas foram aproveitadas. Desta forma, espécies de importantes gêneros como *Adiantum*, *Anemia*, *Blechnum*, *Ctenitis*, *Cyathea*, *Gleichenella*, *Gleichenia*, *Lygodium*, *Macrothelypteris* (um gênero exótico), *Niphidium*, *Pecluma*, *Pteris*, *Rumohra*, *Serpocaulon*, *Sticherus* e *Thelypteris* foram coletadas e estudadas.

2. Seções de interesse

Este trabalho se relaciona a vários aspectos taxonômicos de microfungos que tanto possuem conhecida importância como agentes causais de doenças em plantas agrícolas – como é o caso de cercosporoides e membros da família Mycosphaerellaceae, (p. ex.: agentes causais de manchas foliares em cultivos agrícolas) quanto fungos de menor importância econômica, mas que ainda se apresentam como pouco conhecidos pela ciência (como os membros da ordem Asterinales e da ordem Coryneliales).

2.1. Novidades taxonômicas na família Parmulariaceae

A família Parmulariaceae abriga fungos ascomicetos, parasitas obrigatórios de diversos hospedeiros. Apesar de ter sido tema de diversos estudos e monografias, acredita-se ainda ser pouco conhecida e muitos táxons da família ainda aguardam serem descobertos. Na presente seção, duas novidades taxonômicas foram apresentadas: a nova espécie *Inocyclus angularis* e o novo gênero e sua espécie, *Rhagadolobiospsis thelypteridis*, ambos encontrados em associação com plantas da divisão Pteridophyta no Brasil. Informações acerca de sua distribuição, marcadores morfológicos-chave, bem como um detalhado estudo da ontogenia do ascoma de *Rhagadolobiospsis*, e outras informações foram apresentadas nos trabalhos de Guatimosim *et al.* (2014a, 2014b).

2.2. O posicionamento filogenético da ordem Asterinales

Espécies das famílias Asterinaceae e Parmulariaceae são parasitas obrigatórios que crescem em associação com os tecidos do hospedeiro e produzem ascos bitunicados em ascomas externos, na superfície do hospedeiro. Sua classificação até os dias atuais se deu através, basicamente, de características morfológicas, as quais muitas vezes constituem um sistema de classificação artificial e impreciso. Na presente seção, é apresentada uma análise filogenética baseada nas regiões genômicas ITS e LSU, das espécies tipo de Asterinaceae e Parmulariaceae, bem como outros gêneros relacionados, permitindo o posicionamento da ordem Asterinales dentro da classe Dothideomycetes. As informações completas podem ser encontradas em Guatimosim *et al.* (2015).



Figura 1. *Rhagadolobiospsis thelypteridis* em *Thelypteris serrata*.



Figura 2. *Inocyclus angularis* em *Pleopeltis astrolepis*.



Figura 3. *Parmularia styracis* em *Styrix ferrugineus*.

2.3. Espécies de cercosporoides, e suas formas sexuais, em pteridófitas

Fungos cercosporoides representam um dos mais amplos grupos de hifomicetos e pertencem às famílias Mycosphaerellaceae e Teratosphaeriaceae. Tratam-se de agentes causais de doenças que afetam importantes culturas. No presente estudo, um levantamento sistemático deste grupo de fungos, atacando plantas da divisão Pteridophyta é apresentado. Através de uma minuciosa análise de caracteres morfológicos e bioquímicos, da relação patógeno-hospedeiro, dos padrões de distribuição destes organismos, bem como da análise filogenética de cinco regiões genômicas (Actina, Calmodulina, Fator de Elongação-1 α , ITS e LSU), foram identificadas 21 espécies fúngicas causando doenças em 18 espécies de plantas hospedeiras. Um novo gênero, 16 novas espécies e 8 novas recombinações foram propostas, revelando uma rica diversidade de fungos atacando plantas de Pteridophyta, no Brasil. As descrições completas, bem como, as interessantes análises sobre a evolução deste grupo de fungos comparadas com a evolução de seus hospedeiros, podem ser encontradas no trabalho de Guatimosim *et al.* (2016a).



Figura 4. *Cercospora samambaiae* em *Thelypteris dentata*.

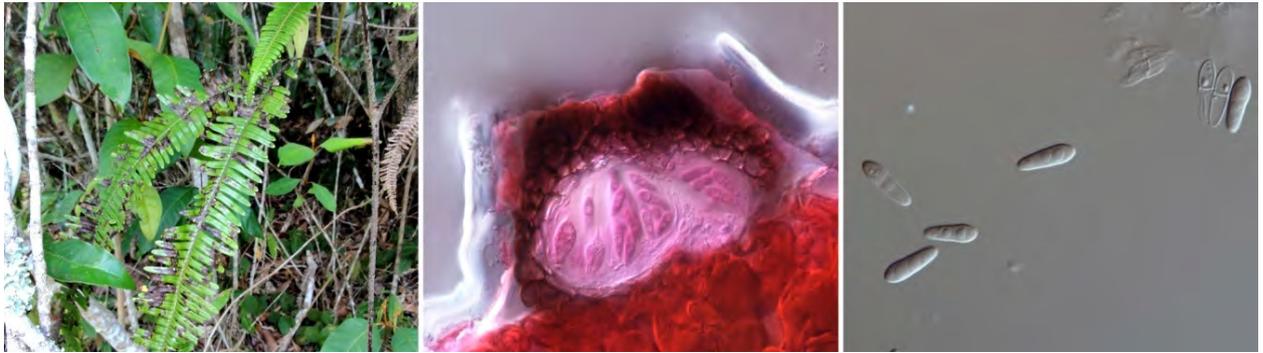


Figura 5. *Clypeosphaerella sticheri* em *Sticherus bifidus*.

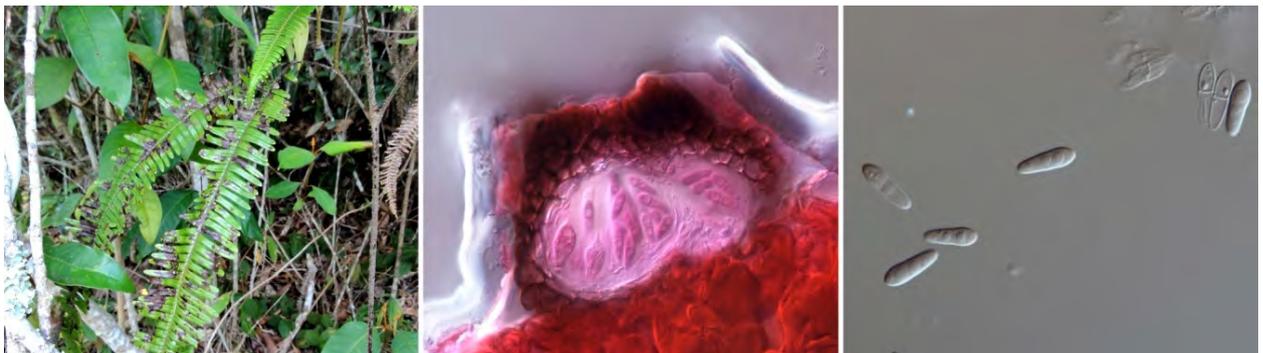


Figura 6. *Neoceratosperma alsophilae* em *Alsophila* sp.



Figura 7. *Neoceratosperma cyatheae* em *Cyathea delgadii*.



Figura 8. *Paramycosphaerella blechni* em *Blechnum serrulatum*.



Figura 9. *Paramycosphaerella cyatheae* em *Cyathea delgadii*.

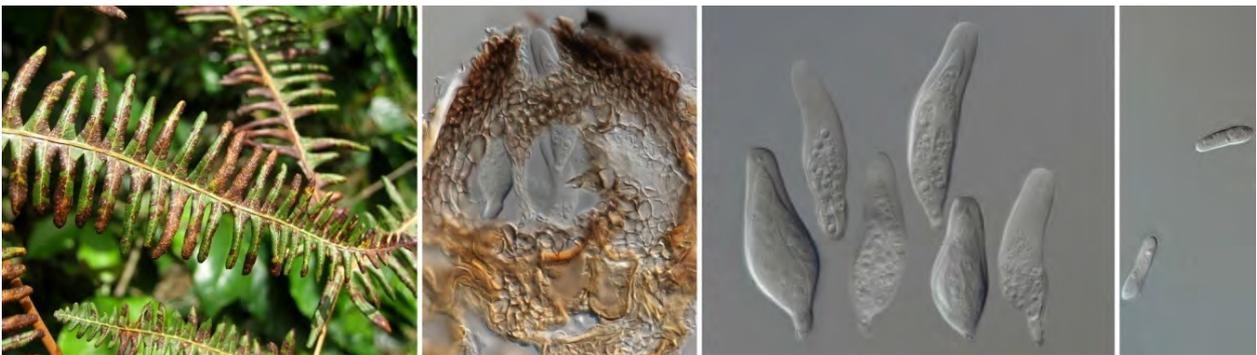


Figura 10. *Paramycosphaerella dicranopteridis-flexuosae* em *Dicranopteris flexuosa*.



Figura 11. *Paramycosphaerella sticheri* em *Sticherus penniger*.

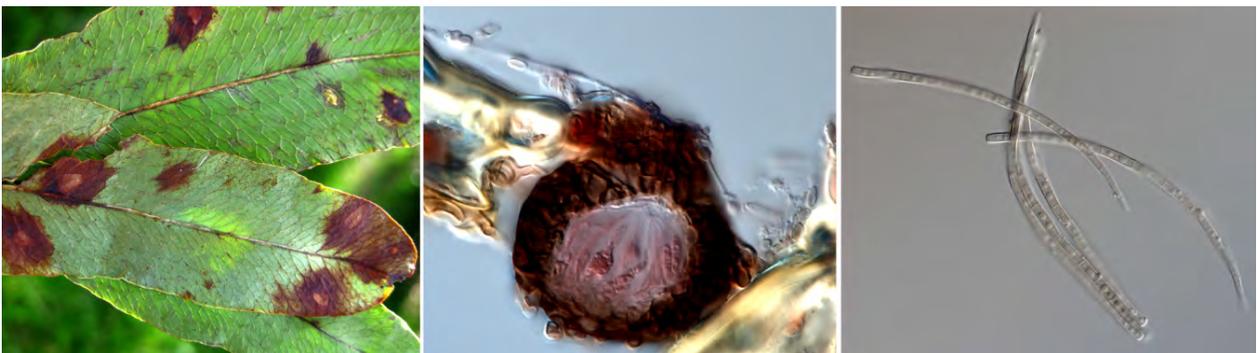


Figura 12. *Phaeophleospora pteridivora* em *Serpocaulon triseriale*.



Figura 13. *Pseudocercospora brackenicola* em *Pteridium arachnoideum*.



Figura 14. *Pseudocercospora paranaensis* em *Cyathea atrovirens*.

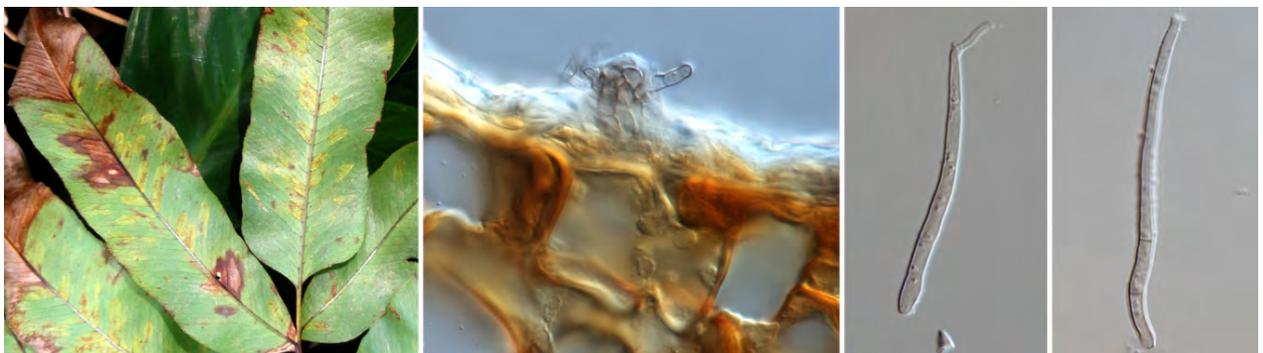


Figura 15. *Pseudocercospora serpocauloncola* em *Serpocaulon triseriale*.

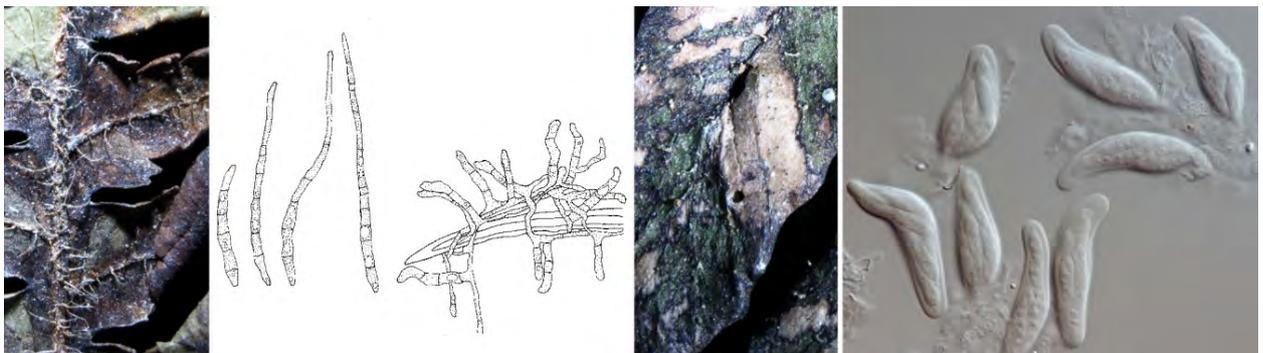


Figura 16. *Pseudocercospora trichogena*.



Figura 17. *Xenomycosphaerella diplazii* *Diplazium* sp.



Figura 18. *Zasmidium cyatheae* em *Cyathea delgadii*.

2.4. Microfungos em pteridófitas

Um levantamento sistemático de fungos patogênicos a samambaias tropicais foi realizado ao longo de sete anos, contemplando a maior parte das regiões do Brasil. Com base na morfologia, relação fungo-hospedeiro e filogenia molecular inferida a partir de sequências de DNA de duas regiões genômicas (ITS e LSU), espécies pertencentes ao complexo de espécies reconhecido como fungos lachinoides, *Chalara* e *Bloxamia* foram identificados. A presente seção contempla a descrição e ilustração de seis novas espécies para a ciência a saber: *Bloxamia cyatheicola*, *Lachnopsis catarinensis*, *L.s dicksoniae*, *Scolecoclachnum pteridii*, *Zymochalara lygodii* e *Z. cyatheae*. Ademais, é apresentado também a epitipificação de *Caliciopsis maxima*, uma espécie brasileira de morfologia distinta e bastante interessante. Todas as informações podem ser encontradas nos trabalhos de Guatimosim *et al.* (2016b) e Crous *et al.* (2018).



Figura 19. *Bloxamia cyatheicola* em *Cyathea delgadii*.



Figura 20. *Lachnopsis catarinensis* em *Dicksonia sellowiana*.



Figura 21. *Lachnopsis dicksoniae* em *Dicksonia sellowiana*.



Figura 22. *Scolecolachnum pteridii* em *Pteridium arachnoideum*.



Figura 23. *Zymochalara cyatheaee* em *Cyathea delgadii*.



Figura 24. *Zymochalara lygodii* em *Lygodium volubile*.

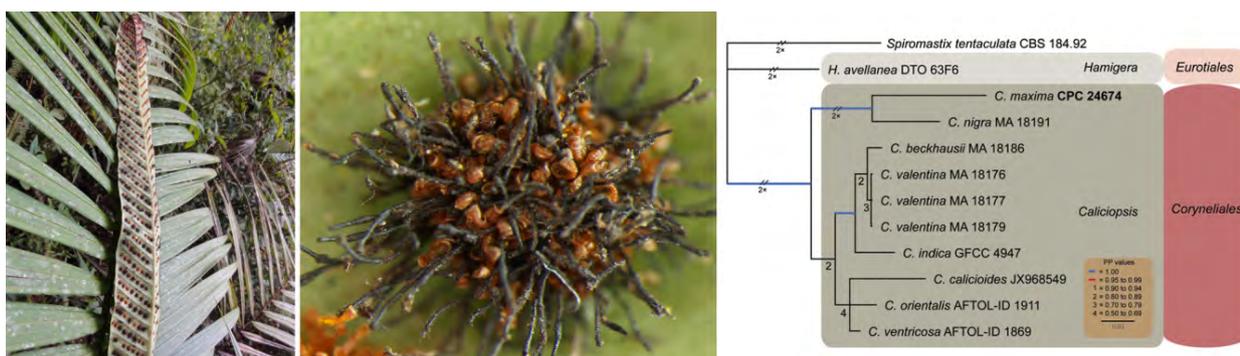


Figura 25. *Caliciopsis maxima* em *Niphidium crassifolium*.

3. Conclusões

O estudo sistemático de fungos associados à pteridófitas, inédito para o Brasil, resultou em diversas novidades em todos os níveis taxonômicos. Sob o ponto de vista objetivo, 100 novas sequências das regiões genômicas ITS e LSU, 57 novas sequências da região genômica ACT, 77 novas sequências da região genômica TEF, 14 novas sequências da região genômica CAL bem como 11 novas sequências da região genômica β -Tub, foram geradas e depositadas em banco de dados público.

Antes deste trabalho, cerca de 48 fungos eram conhecidos como associados a plantas da divisão *Pteridophyta* no Brasil. O trabalho aqui realizado, aumentou de forma significativa este número e forneceu novas informações moleculares que podem ser úteis para uma melhor compreensão da evolução dos grupos de fungos apresentados.

A presente pesquisa indica claramente o valor científico de estudos de microfungos focados em determinado grupo de plantas hospedeiras, como fonte de novidades micológicas. Ele também confirma que micologistas nos trópicos ainda têm dado pouca atenção aos fungos em hospedeiros vegetais que têm limitada relevância econômica, como samambaias. Fungos de pteridófitas no Brasil e em outras regiões tropicais, parecem representar uma parte importante de uma micobiota altamente diversificada, a qual ainda aguarda ser descoberta.

Apesar de nenhum ensaio que buscasse comprovar a patogenicidade das espécies descritas ter sido realizado, diversos fungos destacaram-se como tendo aparente potencial como agentes de biocontrole inundativo para *Pteridium arachnoideum*, podendo-se citar o impacto das doenças causadas por duas espécies a saber: *Pseudocercospora brackenicola* e *Phoma* sp. Estes dois fungos crescem em meio de cultura e ao serem inoculados massalmente sobre a planta-alvo tendem a produzir níveis severos de doença que podem levar as plantas à morte. Ademais, a ferrugem causada pelo fungo *Urediniopsis pteridis* (amplamente distribuída no Brasil) também aparenta causar severos danos à *Pteridium*.

Estudos adicionais são necessários a fim de se elucidar o real potencial dos fungos aqui descritos e relatados como possíveis agentes de biocontrole.

4. Referências

- Adams E.B. 1988. Fungi in classical biocontrol of weeds. In: Burge M.N. *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester, Manchester University Press, USA. p. 111-124.
- Alves J.L., Barreto R.W., Pereira O.L., Soares D.J. 2010. Additions to the mycobiota of the invasive weed *Miconia calvescens* (Melastomataceae). *Mycologia* 102: 69–82.
- Ayres P., Paul N. 1990. Weeding with fungi. *New Scientist* 1732: 36–39.
- Barreto R.W., Ellison C.A., Seier M.K., Evans H.C. 2012. Biological control of weeds with plant pathogens: Four decades on. In: Dharam P.A., Shankar U. (Org.) *Integrated Pest Management Principles and Practice*. 1ed. Wallingford: CABI. p. 299-350.
- Bass D., Richards T.A. 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity ‘on Earth and in the ocean’. *Fungal Biology Review* 25: 159–164.
- BBC - British Broadcasting Corporation. 2019. Ash dieback: Forestry Commission Wales launch survey. [online]. Disponível em <<http://www.bbc.co.uk/news/uk-wales-20210832>> Acesso em 14 de março de 2019.
- Biondi D., Leal L., Martini A., Natal C.M. 2009. Dendrometric characterization of *Dicksonia sellowiana* Hook. in an *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze stand. *Cerne* 15: 453–459.
- Blackwell M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426–438.
- Charudattan R. 1991. The mycoherbicide approach with plant pathogens. In: Tebeest D.O. *Microbial control of weeds*. Chapman & Hall, New York, USA. p. 24-57.
- Dighton J. 2003. *Fungi in ecosystem processes*. CRC Press, Mycology series. USA. 382 p.
- Evans H.C. 1987. Fungal pathogens of some subtropical and tropical weeds and the possibilities for the biological control. *Biocontrol News and Information* 8: 7–30.
- Evans H.C., Ellison C.A. 1990. Classical biological control of weeds with microorganisms: past, present, prospects. *Aspects of Applied Biology* 24: 39–49.
- Fisher M.C., Henk D.A., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.L., Gurr S.J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186–194.
- Ghosheh H.Z. 2005. Constraints in implementing biological weed control: A review. *Weed Biology and Management* 5: 83–92.
- Grandi R.A.P. 2004. Anamorfos da serrapilheira nos vales dos Rios Moji e Pilões, município de Cubatão. *Hoehnea* 31: 225–238.
- Grandi R.A.P., de Valois Silva T. 2006. Fungos anamorfos descompositores do folheto de *Caesalpinia echinata* Lam. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 275–287.
- Guatiimosim E., Pinto H.J., Barreto R.W., Prado J. 2014a. *Rhagadolobiosis*, a new genus of Parmulariaceae from Brazil with a description of the ontogeny of its ascomata. *Mycologia* 106: 276–281.
- Guatiimosim E., Schwartsburd P.B., Barreto R.W. 2014b. A new *Inocyclus* species (Parmulariaceae) on the neotropical fern *Pleopeltis astrolepis*. *IMA Fungus* 5: 51–55.
- Guatiimosim E., Schwartsburd P.B., Barreto R.W., Crous P.W. 2016a. Novel fungi from an ancient niche: cercosporoid and related sexual morphs on ferns. *Persoonia* 37:106–141.
- Guatiimosim E., Schwartsburd P.B., Crous P.W., Barreto R.W. 2016b. Novel fungi from an ancient niche: lachnoid and chalara-like fungi on ferns. *Mycological Progress* 15: 1269–1267.
- Crous P.W., Schumacher R.K., Wingfield M.J., Akulov A., Denman S., Roux J., Braun U., Burgess T.I., Carnegie A.J., Váczy K.Z., Guatiimosim E., Schwartsburd P.B.,

- Barreto R.W., Hernández-Restrepo M., Lombard L., Groenewald J.Z. 2018. New and Interesting Fungi. 1. *Fungal Systematics and Evolution* 1: 169–215.
- Hallett S.G. 2005. Where are the bioherbicides? *Weed-Science* 53: 404–415.
- Hasan S. 1974. Recent advances in the use of plant pathogens as biocontrol agents of weeds. *Pest Articles and News Summaries* 20: 437–443.
- Hasan S. 1980. Plant pathogens and biological control of weeds. *Review of Plant Pathology* 59: 349–355.
- Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641–655.
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422–1432.
- Hawksworth D.L. 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology* 50: 9–18.
- Hawksworth D.L., Rossman A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87: 888–891.
- Holm L., Doll J., Holm E., Pancho R., Herberger J. 1996. *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. John Wiley & Sons, New York. 1152 p.
- Huffaker C.B. 1976. *An overview of biological control, with particular commentary on biological weed control*. In: Freeman TE. Proceedings of the 4th International Symposium on Biological Control of Weeds. University of Florida, Gainesville, USA. p. 3-10.
- Hyde K.D. 2001. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers?*. *Mycological Research* 105: 1514–1518.
- Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2020. [online]. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora>> Acesso em 14 de março de 2019.
- Money N.P. 2006. *The Triumph of the Fungi: Blights, Rusts, and Rots that Reshaped the Earth*. Oxford University Press, UK. 256 p.
- Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. 2004. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands. 777 p.
- Rizzo D.M., Garbelotto M., Davidson J.M., Slaughter G.W., Koike S.T. 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus spp.* and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86: 205–214.
- Rocha F.B., Barreto R.W., Bezerra J.L., Meira Neto J.A.A. 2010. Foliage mycobiota of *Coussapoa floccosa*, a highly threatened tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Mycologia* 102: 1240–1252.
- Smith A.R., Pryer K.M., Schuettelpelz E., Korall P., Schneider H., Wolf P.G. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55: 705–731.
- Stamets P. 2005. *Mycelium running: how mushrooms can help save the world?* Ten Speed Press, Berkeley, USA. 356 p.
- Tebeest D.O., Yang X.B., Cisar C.R. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 30: 637–657.

Fungos Micorrízicos Arbusculares em ambientes aquáticos: o que estamos negligenciando?

QUEIROZ, Mariana Bessa¹; GOMES, Stephania Ruth Basilio Silva¹; VISTA, Xochitl Margarito ²;
LEROY, Juliana Aparecida Souza ²; GOTO, Bruno Tomio ^{1,2}

¹ Departamento de Botânica e Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

² PG Sistemática e Evolução, Departamento de Botânica e Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mails: marianabessaqz@gmail.com, stephaniaruth.basilio@gmail.com, xochitlmargaritovs@gmail.com, julianaleroy@gmail.com, brunogoto@hotmail.com

Resumo

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), famosos pela formação de simbiose com raízes da maioria das famílias de plantas, são comuns em quase todos os ecossistemas terrestres. Entretanto, os ambientes aquáticos têm sido pouco investigados principalmente quanto a diversidade desses microrganismos benéficos. Apesar da notória negligência nas pesquisas sobre diversidade de FMA em áreas alagadas, há informações que requerem atenção. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi inventariar espécies de FMA em 7 ambientes aquáticos lênticos, oligotróficos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Para isso, sedimento rizosférico de 10 famílias de macrófitas aquáticas foram coletados, os glomerosporos extraídos por peneiramento úmido e centrifugação em água e sacarose 50%, montados em lâminas para microscopia, identificados e quantificados. Surpreendentemente, 105 espécies foram observadas distribuídas em 5 ordens, 11 famílias e 21 gêneros. A maior frequência foi das famílias Acaulosporaceae e Glomeraceae, com os gêneros *Acaulospora* e *Glomus* como mais representativos. *Ambispora appendicula* foi a única espécie comum às 7 lagoas. Os índices de diversidade foram elevados, exceto para a Lagoa do Boqueirão e Lagoa Azul, que apresentaram maiores índices de dominância. Os hospedeiros hidrófitos com maior riqueza foram Cyperaceae e Lentibulariaceae. O número de táxons encontrado é elevado, assim como a esporulação, revelando o potencial dos ecossistemas aquáticos em abrigar ampla riqueza de FMA.

Palavras-chave: Ambientes lênticos, Diversidade, Macrófitas aquáticas, Micorriza.

1. Introdução

A micorriza, formada pelos Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) e raízes da maioria das famílias de plantas conhecidas, é um tipo de associação simbiótica muito comum na natureza, tendo em vista que esses organismos coevoluíram desde o início da colonização dos ambientes terrestres pelas plantas, a cerca de 500 milhões de anos (Redecker *et al.*, 2000; Krings *et al.*, 2015). Na micorrizologia, inúmeras vezes parafraseamos J.L. Harley dizemos que as plantas, ao invés de raízes, possuem micorrizas. Tal afirmação poderia refletir, além da funcionalidade desses organismos, a sua onipresença, já documentada em todos os continentes, diversos ecossistemas, colonizando a maior parte das famílias de plantas terrestres (Brundrett, 2009; Steiginger *et al.*, 2019). Entretanto, poderia essa assertiva se estender também aos ambientes aquáticos?

A relevância da simbiose se deve especialmente à proteção e ao maior aporte de nutrientes que esses fungos oferecem aos hospedeiros, recebendo em troca, produtos do metabolismo fotossintético (Parniske, 2008), benefício capaz de justificar a considerável atenção que tem sido dada aos FMA em ecossistemas terrestres, principalmente com objetivo de entender sua biologia, ecologia, e embora com menores esforços, sua taxonomia e diversidade, com novos táxons descritos e reorganizados nas últimas décadas (Oehl *et al.*, 2011, Goto *et al.*, 2012, Błaszowski *et al.*, 2015, Symanczik *et al.*, 2018, Jobim *et al.*, 2019). Comparativamente aos ambientes terrestres, pouca importância tem sido dada para o entendimento desse grupo de fungos em ambientes aquáticos.

A maior parte da superfície do planeta é constituída por ecossistemas aquáticos e embora menos de 3% deles (Pedrozo e Kapusta, 2010) correspondam a ecossistemas continentais (lagos, lagoas, rios, riachos, poços, brejos etc.), compreendem habitats para muitos organismos, entre eles, as macrófitas aquáticas. Macrófitas aquáticas correspondem aos vegetais macroscópicos, cujas partes fotossintéticas estão continuamente, ou por um período,

parcial ou totalmente submersas ou flutuantes na água (Cook, 1996). As primeiras macrófitas investigadas foram não micotróficas (Khan, 1974), sendo o primeiro registro da associação nesses hospedeiros feito apenas três anos depois por Sondergaard e Laegaard (1977).

Mais de quatro décadas se passaram e em decorrência do número limitado de trabalhos desenvolvidos, ainda não é possível compreender a dinâmica de funcionamento da simbiose nesses ecossistemas. Especula-se que a associação atue como uma importante adaptação para a manutenção da comunidade de macrófitas, crescendo em sedimentos pobres em nutrientes como os lagos oligotróficos (Moora *et al.*, 2016). O entendimento da diversidade, por sua vez, é insuficiente, com poucos países, biomas e condições explorados, sendo os trabalhos em sua maioria restritos às zonas temperadas (Miller e Bever, 1999, Kennedy *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2010).

Neste capítulo apresentamos, além de um breve histórico sobre o conhecimento dos FMA em ambientes aquáticos, resultados sobre a diversidade a partir de inventários conduzidos em ambientes aquáticos lênticos oligotróficos no estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil.

1. O que já conhecemos: um breve histórico do estudo dos FMAs em ambientes aquáticos

Os primeiros estudos que efetivamente envolveram a ocorrência de FMA em áreas aquáticas datam do início da década de 70, relatando a ausência da associação para todas as hidrófitas analisadas (Khan, 1974). Pesquisas posteriores mostraram a presença da associação endomicorrízica em ambientes aquáticos eutróficos e oligotróficos (Sondergaard e Laegaard, 1977, Bagyaraj *et al.*, 1979), contrariando o cenário inicial da época.

A década posterior marca o início dos questionamentos ecológicos para relacionar fatores bióticos e abióticos que influenciam a ocorrência desses fungos. Nessa perspectiva, variáveis como profundidade, pH e hospedeiros vegetais foram analisadas (Keeley *et al.*, 1980, Chaubal *et al.*, 1982, Clayton e Bagyaraj, 1984, Farmer, 1985). Além disso, a partir de abordagens experimentais, investigou-se os efeitos dos FMA no crescimento de plantas aquáticas como, por exemplo, em *Ranunculus* spp. Contudo, os resultados mostraram que os fungos não foram eficientes em promover o crescimento dos hospedeiros (Tanner e Clayton, 1985).

Os estudos com o objetivo de entender a importância da associação em macrófitas continuaram na década de 90 (Ragupathy *et al.*, 1990), agora expandindo para hospedeiros sob influência de ambientes salinos e longos períodos de inundação (Sengupta e Chaudhuri, 1990, Wigand e Stevenson, 1994). Somando-se a isso, novas variáveis ambientais foram testadas, por exemplo, o potencial redox (Khan, 1993) e dinâmica do gradiente da água (Stevens e Peterson, 1996, Miller e Bever, 1999). Até esse momento, o foco das análises permanecia nas abordagens ecológicas (Wetzel e Van der Valk, 1996, Wigand e Stevenson, 1997, Wigand *et al.*, 1998, Cooke e Lefor, 1998, Nielsen *et al.*, 1999), mas concomitantemente, tiveram início as primeiras revisões sobre o tema (Khan e Balik, 1995), salientando a necessidade de mais pesquisas ecológicas e uma nova fase compreendida pelos trabalhos sobre diversidade.

Na virada do século, surgiram trabalhos mostrando o potencial das micorrizas na restauração dos ecossistemas aquáticos (McHugh e Dighton, 2004). Os estudos sobre diversidade, ainda em número limitado, trouxeram significativas contribuições, aumentando o número de espécies reportadas (Marins *et al.*, 2009, Rodrigues e Anuradha, 2009, D'Souza e Rodrigues, 2013). O período é ainda marcado pelo pioneirismo nas pesquisas em biologia molecular, as quais mostraram a presença de diversas famílias, além de táxons virtuais, incluindo sequências de novas espécies (Baar *et al.*, 2011, Moora *et al.*, 2016, Ban *et al.*, 2017). Aliados aos estudos morfológicos, os estudos moleculares permitiram a descrição da primeira, e até o momento única, espécie oriunda de sedimentos aquáticos, *Rhizoglosum melanum*, em ambiente lêntico da Noruega (Sudová *et al.*, 2015).

3. FMA em ecossistemas aquáticos do Rio Grande do Norte

3.1 Área de estudo e amostragem

Foram inventariadas sete lagoas do litoral do estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil, distribuídas em 5 municípios: Extremoz (Lagoa de Genipabu), Maxaranguape (Lagoa Azul), Nísia Floresta (Lagoa de Alcaçuz, Lagoa de Arituba e Lagoa do Carcará), Parnamirim (Lagoa do Jiqui) e Touros (Lagoa do Boqueirão), representadas na figura 1.

Os ecossistemas aquáticos do Rio Grande do Norte representam 3,4% da extensão hidrológica do Brasil, ocupando a região hidrográfica Atlântico Nordeste (Agência Nacional de Águas, 2019) e se distribuem em áreas influenciadas pelos subdomínios climáticos úmido, semiúmido e semiárido (Moura, 2007, Diniz e Pereira, 2015). Na maioria das regiões estudadas há predominância do bioma Mata Atlântica, um dos principais *hotspots* mundiais, que em termos de riqueza de FMA já soma 128 espécies reportadas (Jobim *et al.*, 2018), com exceção da Lagoa do Boqueirão e Azul, sob domínio do semiárido.

Entre os anos de 2016 e 2018, solos rizosféricos de diferentes famílias de macrófitas aquáticas foram coletados (0-20 cm). Os solos foram levados para o laboratório onde foram submetidos ao método de peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose 50% (Jenkins, 1964) para extração dos glomerosporos, posteriormente montados em lâminas permanentes, quantificados e identificados seguindo bibliografia específica.

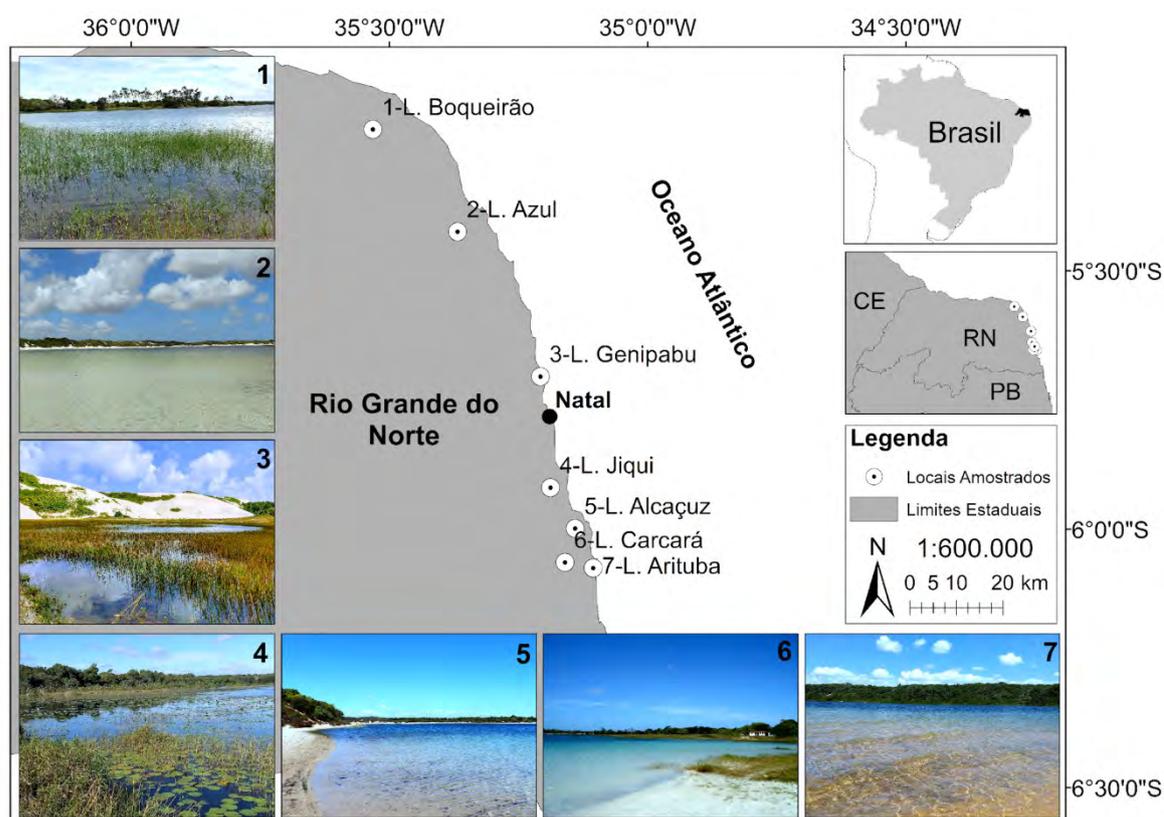


Figura 1. Mapa de localização das áreas de estudo. 1: Lagoa do Boqueirão. 2: Lagoa Azul. 3: Lagoa de Genipabu. 4: Lagoa do Jiqui. 5: Lagoa de Alcaçuz. 6: Lagoa do Carcará. 7: Lagoa de Arituba.

3.2 Diversidade de FMA

Um total de 105 espécies de FMA, distribuídas em 5 ordens, 11 famílias e 21 gêneros foram encontradas nos diferentes ambientes investigados. Na figura 2 verifica-se o perfil de representatividade das ordens, famílias e gêneros de FMA.

Aproximadamente 317 espécies compõem o filo Glomeromycota (Goto e Jobim, 2019), das quais 126 pertencem à ordem Glomerales e 93 à Diversisporales com suas famílias Glomeraceae e Acaulosporaceae e os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* com maior número de espécies. Tendo em vista a maior riqueza desses gêneros, assim como sua capacidade de adaptação em diferentes ambientes (Carrenho, 1998), atribui-se maior frequência encontrada para esses grupos na condição terrestre como, por exemplo, em fitofisionomia de Mata Atlântica (Andrade *et al.*, 2000, Aidar *et al.*, 2004, Bonfim *et al.*, 2013, Pereira *et al.*, 2018). É evidente a similaridade

entre os ambientes terrestres e aquáticos, já que essas ordens (40,95% e 26,66%), famílias (37,14% e 22,85%) e gêneros (19,04% e 21,90%) também ocorrem com maior frequência nas condições aquáticas estudadas. Outros trabalhos desenvolvidos na condição aquática, tanto em áreas temperadas (Khai e Ziwei, 2006, Baar *et al.*, 2011), quanto tropicais (Marins *et al.*, 2009) apontaram os mesmos representantes.

A espécie com maior número de ocorrências foi *Ambispora appendicula* (Spain, Sieverd., N.C. Schenck) C. Walker, presente nas sete lagoas. *Acaulospora tuberculata* Janos & Trappe, *Ambispora leptoticha* (N.C. Schenck & T.H. Nicolson) Walker, Vestberg & A. Schüssler (fase globoide) e *Glomus spinuliferum* Sieverd. & Oehl ocorreram em seis e *Rhizogloium clarum* (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Sieverd., G.A. Silva & Oehl ocorreu em cinco. Com exceção de *Glomus spinuliferum*, as demais já foram registradas na condição aquática e são comumente encontradas em ecossistemas terrestres. *Ambispora appendicula*, *Acaulospora tuberculata* e *Rhizogloium clarum* por exemplo, estão entre as espécies com ampla distribuição nos ecossistemas brasileiros (Souza *et al.*, 2008; Goto *et al.*, 2010, Jobim *et al.*, 2016, 2018, Marinho *et al.*, 2018).

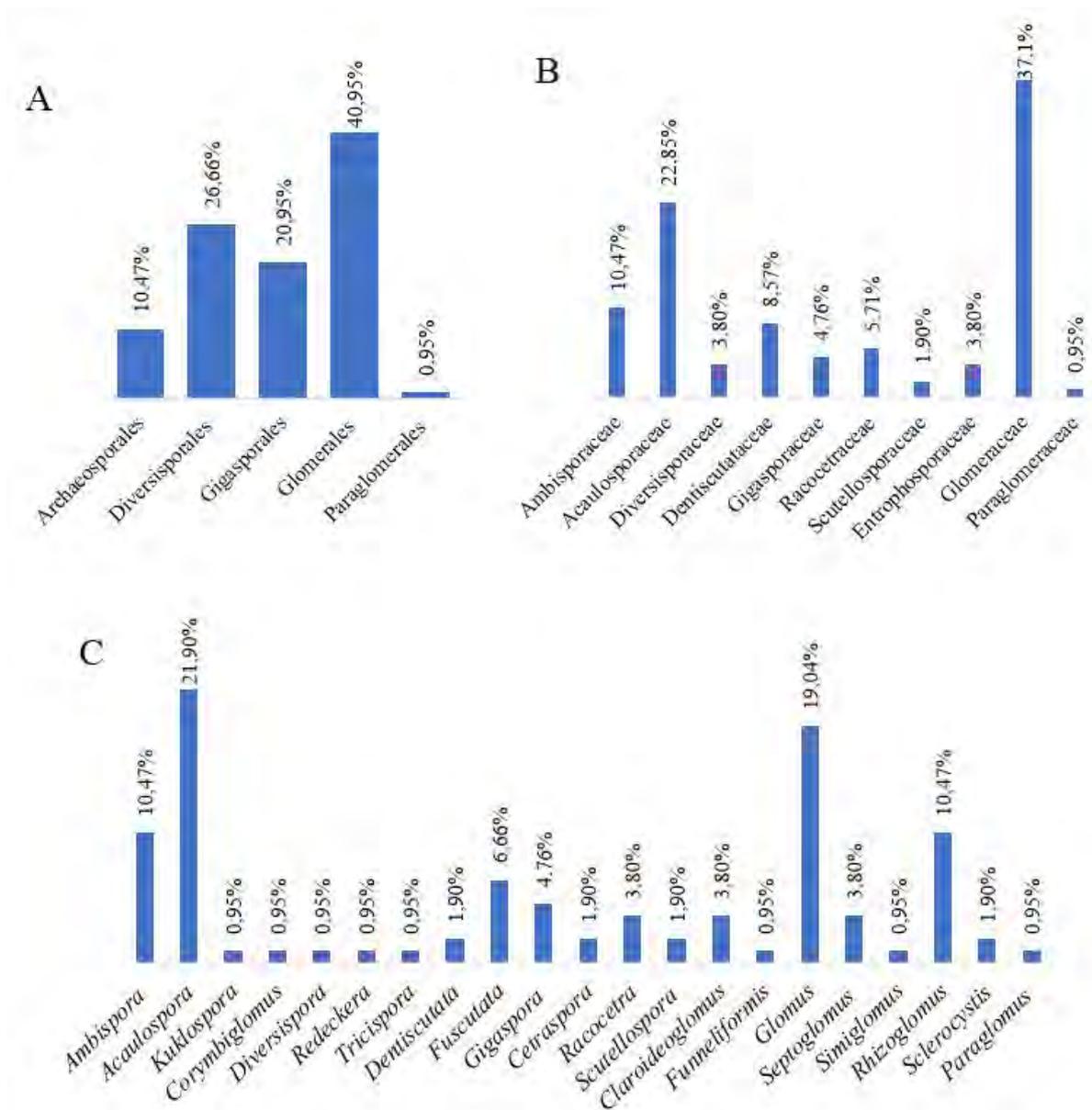


Figura 2. Representatividade (%) das espécies de FMA por ordens (A), famílias (B) e gêneros (C) em lagoas do Rio Grande do Norte, Brasil.

Até o momento, em torno de 80 espécies de FMA foram registradas em condições aquáticas em todo o mundo (dados não mostrados), quantidade inferior a riqueza presente nas sete lagoas investigadas. Considerando cada ponto de coleta individualmente, é possível notar que o número de espécies (Figura 3A) principalmente na Lagoa de Alcaçuz (50) e Lagoa de Arituba (49) é superior à média encontrada em outros estudos para ecossistemas aquáticos. Miller e Bever (1999) e Kai e Ziwei (2006), por exemplo, encontraram sete e onze espécies, respectivamente, Baar *et al.* (2011) e Moora *et al.* (2016) através de dados de sequenciamento ambiental, encontraram 23 e 47 espécies respectivamente.

Mesmo com número de trabalhos limitado, as áreas aquáticas tropicais têm exibido seu potencial em abrigar ampla riqueza de FMA. Rodrigues e Anuradha (2009) identificaram 17 espécies e D'Souza e Rodrigues (2013) 28, sendo este último o maior número já identificado por meio de abordagem morfológica. Para o Brasil, o único inventário foi conduzido na região Sul do país, revelando 27 espécies (Marins *et al.*, 2009).

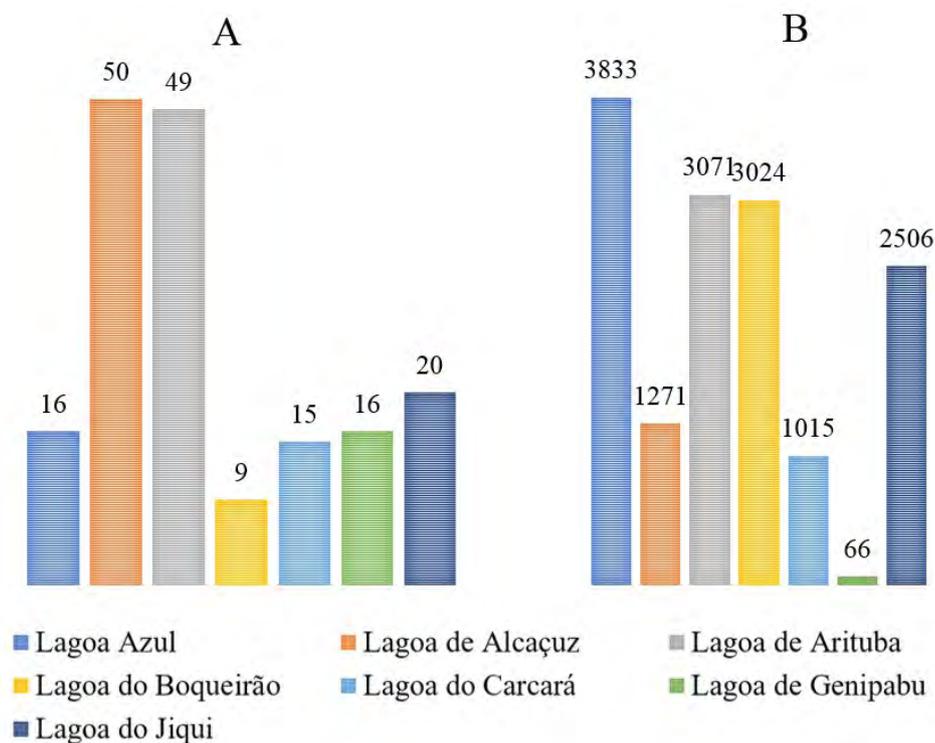


Figura 3. Número de espécies (A) e de esporos (B) de FMA (1500 g^{-1} de solo) nos 7 ambientes aquáticos avaliados no Rio Grande do Norte, Brasil.

Os glomerosporos são estruturas quiescentes que germinam em condições apropriadas e constituem as unidades de identificação das espécies de FMA (Goto e Maia 2006, Maia *et al.*, 2010). Estudos têm investigado os fatores que afetam a taxa de esporulação e têm encontrado relação principalmente com fatores físico-químicos do solo como pH e nutrientes (Ramos *et al.*, 2008, Moreira e Siqueira, 2002). Porém, a umidade do solo também tem sido considerada um fator determinante, com relação inversamente proporcional, onde a taxa de esporulação diminui com o aumento da umidade (Khan, 1974), uma das razões pela qual poucos trabalhos foram realizados nesses ambientes quando comparados aos ecossistemas terrestres. Quantificamos apenas os esporos viáveis ao total (14.786 em 10.500 g^{-1} de solo, com variação de $0,05$ a $2,7$ por g^{-1} de solo), apresentando o somatório para cada uma das lagoas (figura 3B). O número é maior, sobretudo para a Lagoa Azul. Chaubal *et al.* (1982), em diferentes pontos alagados encontraram de $0,12$ a $0,68$ por g^{-1} e em diferentes domínios nos ambientes terrestres já foi detectado resultado similar ao encontrado neste trabalho. Na Caatinga, Sousa *et al.* (2014), por exemplo, já encontraram de $0,1$ a $0,9$ esporos por g^{-1} de solo e Silva *et al.* (2016) encontraram $2,7$

na Mata Atlântica. A maior taxa de esporulação e número de espécies mostra a adaptação desses organismos a condições alagadas.

Ademais, os índices de diversidade de Shannon, apresentados na tabela 1, também são elevados para a maioria das lagoas.

Menores índices foram encontrados na Lagoa do Boqueirão e Lagoa Azul, que em contrapartida, apresentaram maiores índices de dominância. Ao estabelecer uma relação com o número de esporos, a presença de espécies dominantes é facilmente observada (Figura 3). Lagoas com maiores números de esporos não necessariamente indicam maior número de espécies. A Lagoa Azul, por exemplo, apresentou o maior número de esporos e menor número de espécies se comparada a Lagoa de Alçaçuz e Lagoa de Arituba. A Lagoa do Boqueirão, por sua vez, também apresentou alta esporulação e menor número de espécies em relação às demais.

Tabela 1. Índices de diversidade e dominância de FMA nas sete lagoas do Rio Grande do Norte, Brasil.

Local/Lagoa	Shannon	Dominância
Azul	0,92	0,59
Alçaçuz	2,57	0,13
Arituba	2,46	0,17
Boqueirão	0,05	0,98
Carcará	1,87	0,22
Genipabu	1,97	0,24
Jiqui	1,63	0,25

3.3 Hospedeiros vegetais

Os 14.786 esporos e as 105 espécies de FMA estavam presentes na rizosfera de representantes de 10 famílias vegetais: Alismataceae, Araceae, Cabombaceae, Characeae, Cyperaceae, Lentibulareaceae, Menyanthaceae, Nymphaeaceae, Pontenderiaceae e Xyridaceae. A família vegetal com maior representatividade em riqueza de FMA foi Cyperaceae (40 spp.) seguida de Lentibulareaceae (24 spp.) (Figura 4.).

A família Cyperaceae é reconhecida como não micotrófica ou pouco suscetível à micorrização (Gerdemann, 1968, Hirsch e Kapulnik, 1998) em condições terrestres, e em condições submersas, Khan (1974) também a considerou não micotrófica. Entretanto, Muthukumar *et al.* (2004) mostraram índices significativos de colonização micorrízica em membros dessa família. A família Lentibulareaceae, por sua vez, abriga abriga espécies de hábito particular carnívoro e teve dois representantes contemplados em estudos na condição submersa tropical: *Utricularia reticulata* Smith., na qual não foi detectada colonização e presença de esporos em sua rizosfera (Radhika e Rodrigues, 2007), e *Utricularia* sp. que se apresentou micotrófica (Chaubal *et al.*, 1982).

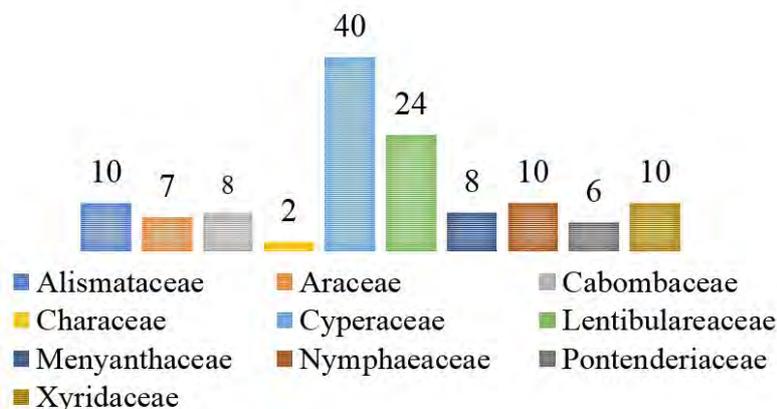


Figura 4. Número de espécies de FMA identificadas na rizosfera das famílias de macrófitas aquáticas.

A família Characeae foi a menos expressiva com apenas duas espécies de FMA registrada em sua rizosfera. Nela estão agrupados representantes das algas verdes, sendo citada em apenas um estudo em região aquática subtropical (Iqbal *et al.*, 1988). Xyridaceae é a única família sem relatos anteriores em estudos envolvendo FMA nos sistemas aquáticos.

4. Conclusões

Os ecossistemas aquáticos, especialmente lênticos oligotróficos, são tão ricos e diversos em espécies de FMA quanto os ecossistemas terrestres nas zonas tropicais.

As ordens Glomerales e Diversisporales possuem maior representatividade nos dois ambientes, assim como os gêneros *Acaulospora* e *Glomus*.

Algumas espécies de FMA são compartilhadas entre diferentes lagoas, sobretudo, aquelas que também são generalistas em condições terrestres.

A taxa de esporulação é similar e/ou superior ao alto número encontrado em ecossistemas terrestres.

Todavia, lagoas com maiores números de esporos, não necessariamente apresentam maior número de espécies, tendo em vista que algumas possuem maiores índices de dominância.

O número de espécies de FMA varia com as famílias vegetais.

Apesar de citada como não micotrófica, a família Cyperaceae na condição aquática abriga grande número de espécies de FMA em sua rizosfera.

Referências

- Aidar M.P.M., Carrenho R., Joly C.A. 2004. Aspect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in na Atlantic forest chronosequence Parque Estadual Turístico do Alto da Ribeira (PETAR), SP. *Biota Neotropica*, 4(2):1-15.
- Andrade A.C.S., Queiroz M.H., Hermes R.A.L., Oliveira V.L. 2000. Mycorrhizal status of same plants of the Araucaria Forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. *Mycorrhiza*, 10:131-136.
- Baar J., Esther C.H.E.T., Lucassenc K.A.H.E., Redecker D., Jan G.M.R.F., Alfons J.P.S. 2011. Molecular analysis of AMF diversity in aquatic macrophytes: a comparison of oligotrophic and ultra-oligotrophic lakes. *Aquatic Botany*, 94:53-61.
- Bagyaraj D.J., Manjunath, A., Patil, R.B. 1979. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas in some tropical aquatic plants. *Transactions of the British Mycological Society*, 72:164-167.
- Ban Y., Jiang Y., Li M., Zhang X., Zhang S., Wu Y., Xu Z. 2017. Homogenous stands of a wetland grass living in heavy metal polluted wetlands harbor diverse consortia of arbuscular mycorrhizal fungi. *Chemosphere*, 181:699-709.
- Błaszowski J., Chwat G., Górska A., Ryska P., Kovács G.M. 2015. Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. nov. in Glomeromycota. *Nova Hedwigia*, 100:225-238.
- Bonfim J.A., Vasconcellos R.L.F., Stürmer S.L., Cardoso E.J.B.N. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian Atlantic forest: A gradient of environmental restoration. *Applied Soil Ecology*, 71:7-14.
- Brundrett M.C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*, 320:37-77.
- Carrenho R. 1998. *Influência de diferentes espécies de plantas hospedeiras e fatores edáficos no desenvolvimento de Fungos Micorrízicos Arbusculares*. (Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista). 226 p.
- Chaubal R., Sharma, G.D.; Mishra, R.R. 1982. Vesicular arbuscular mycorrhiza in subtropical aquatic and marshy plant communities. *Proceedings: Plant Sciences*, 91:69-77.
- Clayton J.S., Bagyaraj D.J. 1984. Vesicular-arbuscular mycorrhizas in submerged aquatic plants of New Zealand. *Aquatic Botany*, 19:251-262.

- Cook C.D.K. 1996. *Water plants of the world*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands. 902 p.
- Cooke J.C., Lefor, M.W. 1998. The mycorrhizal status of selected plant species from Connecticut wetlands and transition zones. *Restoration Ecology*, 6:214-222.
- D'souza J., Rodrigues B.F. 2013. Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi in mangroves of Goa in West India. *Journal of Forestry Research*, 24:515-523.
- Diniz M.T.M., Pereira V.H.C. 2015. Climatologia do estado do Rio Grande do Norte, Brasil: Sistemas atmosféricos atuantes e mapeamento de tipos de clima. *Boletim Goiano de Geografia*, 35(3):488-506.
- Farmer A.M. 1985. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in isoetid-type submerged aquatic macrophytes under naturally varying conditions. *Aquatic Botany*, 21:245-249.
- Gerdemann J.W., Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46:235-244.
- Gerdemann J.W. 1968. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and plant growth. *Annual Review of Phytopathology*, 6:397-418
- Goto B.T., Maia L.C. 2006. Glomerospores: a new denomination for the spore of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. *Mycotaxon*, 96:129-132.
- Goto B.T., Silva G.A., Yano-Melo A.M., Maia C.M. 2010. Checklist of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) in the Brazilian semiarid. *Mycotaxon*, 113:251-254.
- Goto B.T., Silva G.A., Assis D.M.A., Silva D.K.A., Souza R.G., Ferreira A.C.A., Jobim K., Mello C.M.A., Vieira H.E.E., Maia L.C., Oehl F. 2012. Intraornatosporaceae (Gigasporales), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon*, 119:117-132.
- Goto B.T., Jobim K. 2019. Laboratório de Biologia de Micorrizas. [on line]. Disponível em: < <http://glomeromycota.wixsite.com/lbmicorrizas> >. Acesso em: 08 abril.2019.
- Hirsch AM, Kapulnik Y. (1998) Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: comparisons with the Rhizobium-legume symbiosis. *Fungal Gene Biology*, 23:205-212.
- Iqbal S.H., Shahjahan., Nasim G. 1988. Vesicular arbuscular mycorrhiza in an alga: *Chara* sp. *Biologia*, 34:279-281.
- Jenkins W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 4(8):692.
- Jobim K., Goto B.T. 2016. Checklist of the Glomeromycota in the Brazilian Savanna. *Mycotaxon*, 131:255.
- Jobim K., Vista X.M., Goto B.T. 2018. Updates on the knowledge of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycotina) in the Atlantic Forest biome- an example of very high species richness in the Brazilian landscape. *Mycotaxon*, 133(1):209-209.
- Jobim K., Błaszowski J., Niezgodą P., Kozłowska A., Zubek S., Mleczko P., Chachuła P., Ishikawa N.K., Goto B.T. 2019. New sporocarpic taxa in the phylum Glomeromycota: *Sclerocarpum amazonicum* gen. et sp. nov. in the family Glomeraceae (Glomerales) and *Diversispora sporocarpia* sp. nov. in the Diversisporaceae (Diversisporales). *Mycological Progress*, 18:369-384.
- Kay W., Zhiwei Z. 2006. Occurrence of Arbuscular Mycorrhizas and Dark Septate Endophytes in Hydrophytes from Lakes and Streams in Southwest China. *International Review of Hydrobiology*, 91:29-37.
- Kennedy L.J., Tiller R.L., Stutz J.C. 2002. Associations between arbuscular mycorrhizal fungi and *Sporobolus wrightii* in riparian habitats in arid South-western North America. *Journal of Arid Environments*, 50:459-475.
- Keeley J.E. 1980. Endomycorrhizae influence growth of blackgum seedlings in flooded soils. *American Journal of Botany*, 67:6-9.
- Khan A.G. 1974. The Occurrence of Mycorrhizas in Halophytes, Hydrophytes and Xerophytes, and of Endogone Spores in Adjacent Soils. *Journal of General Microbiology*, 81:7-14.
- Khan A.G. 1993. Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New South Wales, Australia. *Mycorrhiza*, 3:31-38.
- Khan A.G., Belik M. 1995. Occurrence and ecological significance of mycorrhizal symbiosis in aquatic plants. In Varma A, Hock B (eds.) *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Berlin, Springer, 627-666 p.

- Krings M., Taylor T.N., Kerp H., Walker C. 2015. Deciphering interfunal relationships in the 410-million-yr-old Rhynie chert: Sporocarp formation in glomeromycotan spores. *Geobios*, 48:449-458.
- Maia L.C., Silva F.S.B., Goto B.T. 2010. Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomerosporos. In: José Oswaldo Siqueira; Francisco A. de Souza; Elke J.B.N. Cardoso; Siu Mui Tsai. (Org.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*. 1ed. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, v. 1, p. 119-132.
- Marinho F., Silva I.R., Oehl F., Maia L.C. 2018. Checklist of arbuscular mycorrhizal fungi in tropical forests. *Sydowia*, 70:107-127.
- Marins J.F., Carrenho R., Thomaz S.M. 2009. Occurrence and coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in aquatic macrophytes in a tropical river-floodplain system. *Aquatic Botany*, 91:13-19.
- Mchugh J.M., Dighton J. 2004. Influence of mycorrhizal inoculation, inundation period, salinity, and phosphorus availability on the growth of two salt marsh grasses, *Spartina alterniflora* Lois. and *Spartina cynosuroides* (L.) Roth., in nursery systems. *Restoration Ecology*, 12:533-545.
- Miller S.P., Bever J.D. 1999. Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in stands of the wetland grass *Panicum hemitomon* along a wide hydrologic gradient. *Oecologia*, 119:586-590.
- Moora M., Öpik M., Davison J., Jairus T., Vasar M., Zobel M., Eckstein R.L. 2016. AM fungal communities inhabiting the roots of submerged aquatic plant *Lobelia dortmanna* are diverse and include a high proportion of novel taxa. *Mycorrhiza*, 26:735-745.
- Moreira F.M.S., Siqueira J.O. 2002. Microbiologia e Bioquímica do solo. Editora UFLA, Lavras, 625 p.
- Moura M.D., Galvincto J.D., Brito L.D.L., Souza L.D., Sá I.I.S., Silva T.D. 2007. Clima e água de chuva no Semi-Árido. Potencialidades da água de chuva no semi-árido brasileiro. Petrolina: *Embrapa Semi-Árido*, 1:37-59.
- Muthukumar T., Udaiyan K., Shanmughavel P. 2004. Mycorrhiza in sedges an overview. *Mycorrhiza*. 14:65-77.
- Nielsen S.L., Thingstrup I., Wigand C. 1999. Apparent lack of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) in the seagrasses *Zostera marina* L. and *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Aquatic Botany*, 63:261-266.
- Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J., Ineichen K., Silva G.A.S. 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA fungus*, 2:191-199.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis. *Nature Reviews Microbiology*, 6:763-775.
- Pedrozo C.A., Kapusta S.C. 2010. Indicadores ambientais em ecossistemas aquáticos. IFRS, Porto Alegre, 14 p.
- Pereira C.M.R., Silva D.K.A., Ferreira A.C.A., Goto B.T., Maia L.C. 2014. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Atlantic forest areas under different land uses. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 185:245-252.
- Pontes J.S., Oehl F., Pereira C.D., Machado C.T.T., Coyne D., Silva D.K.A., Maia L.C. 2017. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. *Applied Soil Ecology*, 117-118:178-189.
- Radhika K.P., Rodrigues B.F. 2007. Arbuscular Mycorrhizae in association with aquatic and marshy plant species in Goa, India. *Aquatic Botany*, 86:291-294.
- Ragupathy S., Mohankumar V., Mahadevan A. 1990. Occurrence of vesicular-Arbuscular mycorrhizae in tropical hydrophytes. *Aquatic botany*, 36:287-291.
- Ramos A.C., Façanha A.R., Feijó J.A. 2008. Proton (H+) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*, 178:177-188.
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486):1920-1921.
- Rodrigues B.F., Anuradha N.N. 2009. Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the 'Khazan Land' Agro-Ecosystem. *Frontiers in Fungal Ecology. Diversity and Metabolites*: 141-150.
- Sengupta A., Chaudhuri S. 1990. Vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in pioneer salt marsh plants of the Ganges river delta in West Bengal (India). *Plant and Soil*, 122:111-113.

- Silva C.F., Pereira M.G., Santos V.L., Miguel D.L., Silva E.M.R. 2016. Fungos Micorrízicos Arbusculares: composição, comprimento de micélio extrarradicular e glomalina em áreas de Mata Atlântica, Rio de Janeiro. *Ciência Florestal*, 26: 419-433.
- Steidinger B.S., Crowther T.W., Liang J., Van Nuland M.E., Werner G.D.A., Reich P.B., Nabuurs., De-Miguel S., Zhou M., Picard N., Hérault B., Zhao X., Zhang C., Routh D., Peay K.G. 2019. Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature*, 569:404-408.
- Sousa C.S., Menezes R.S.C., Sampaio E.V.S.B., Lima F.S., Maia L.C., Oehl F. 2014. Arbuscular Mycorrhizal Fungi in successional stages of caatinga in the semi-arid region of Brazil. *Ciência Florestal*, 24:137-148.
- Souza F.A., Stürmer S.L.; Carrenho R., Trufem S.F.B. 2008. Classificação e taxonomia de fungos Micorrízicos Arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. Editora UFPA, Lavras, 15-73 p.
- Søndergaard M., Laegaard S. 1977. Vesicular–arbuscular mycorrhiza in some aquatic vascular plants. *Nature*, 268:232-233.
- Sudová R., Sýkorová Z., Rydlová J., Čvrtlíková M., Oehl F. 2015. *Rhizoglyphus melanum*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species associated with submerged plants in freshwater lake Avsjøen in Norway. *Mycological progress* 14:9.
- Stevens K.J., Peterson R.L. 1996. The effect of a water gradient on the vesicular-arbuscular mycorrhizal status of *Lythrum salicaria* L. (purple loosestrife). *Mycorrhiza*, 6:99-104.
- Symanczik S., Al-yahya'ei M.N., Kozłowska A., Ryska P., Błaszowski J. 2018. A new genus, *Desertispora*, and a new species, *Diversispora sabulosa*, in the family Diversisporaceae (order Diversisporales, subphylum Glomeromycotina). *Mycological Progress*, 17:437-449.
- Tanner C.C., Clayton J.S. 1985. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on growth and nutrition of a submerged aquatic plant. *Aquatic Botany*, 22:377-386.
- Wang Y., Qiu Q., Yang Z., Hu Z., Tam N.F., Xin G. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi in two mangroves in South China. *Plant and Soil*, 331:181-191.
- Wigand C., Stevenson J.C. 1994. The presence and possible ecological significance of mycorrhizae of the submersed macrophyte, *Vallisneria americana*. *Estuaries*, 17:206-215.
- Wigand C., Stevenson J.C. 1997. Facilitation of phosphate assimilation by aquatic mycorrhizae of *Vallisneria americana* Michx. *Hydrobiologia*, 342/343:35-41.
- Wigand C., Andersen F.Ø., Christensen K.K., Holmer M., Jensen H.S. 1998. Endomycorrhizae of isoetids along a biogeochemical gradient. *Limnology and Oceanography*, 43:508-515.
- Wetzel P.R., Valk A.G.V.D. 1996. Vesicular–arbuscular mycorrhizae in prairie pothole wetland vegetation in Iowa and North Dakota. *Canadian Journal of Botany*, 74:883-890. *Journal of Botany*, 74: 883-890.

Macrofungos como indicadores da qualidade do habitat e a mudança climática

QUEZADA, Maura L.¹; LOPEZ-MAYORGA, Roxanda¹; SUNUM, Rosa²; PEREZ-SILVA, Evangelina³; PAPA, María⁴; HERRERA, Juan Pablo¹; HERNÁNDEZ, Bianka¹

¹Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala

²Instituto Nacional de Bosques, Guatemala

³Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México

⁴Escuela de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala

Emails: quezada.maura@usac.edu.gt, mlquezadaa@gmail.com, roxandalopez@gmail.com, r.sunum@gmail.com, psilva@ib.unam.mx, mepv33@gmail.com, elvenprayer@gmail.com, hernandezbianka2@gmail.com

Resumo

As florestas tropicais desempenham um papel importante na regulação do clima, dada sua alta diversidade biológica, que é fundamental nos ciclos de carbono e água. No entanto, eles também são os mais ameaçados pelas mudanças climáticas no uso da terra e no clima. Os macrofungos desempenham papéis importantes como micorrizas e degradadores, e é por isso que eles são elementos-chave nos ecossistemas, no entanto até hoje são pouco estudados. O presente trabalho apresenta a análise do uso de macrofungos como indicadores biológicos em diferentes ecossistemas na Guatemala. Os primeiros estudos objetivaram avaliar a frequência de fungos degradadores em relação ao tipo de habitat, remanescente e características da paisagem. Posteriormente, estudos de análise dos padrões de frutificação na floresta nublada foram realizados. E nos últimos anos, a relação entre a diversidade de macrofungos com atributos de vegetação e variáveis microclimáticas foi avaliada. Para as florestas, os macro-rotíferos degradantes respondem negativamente à perda de habitat. Nas florestas nubladas, os padrões de frutificação mostram uma forte relação entre a abundância de basidiomas e a temperatura. Além disso, a frequência de macrofungos foi mais relacionada ao diâmetro da copa, assim como a maior biomassa em locais com maior frequência de espécies arbóreas. Para as florestas secas, a composição dos macrofungos foi altamente relacionada aos atributos da vegetação, enquanto as variáveis microclimáticas não apresentaram relação significativa. Portanto, esses resultados mostram que os macrofungos podem ser utilizados como indicadores na avaliação do estado de conservação das florestas, bem como os efeitos das mudanças climáticas.

Palavras-chave: Fungos degradadores, Micorrizas, Fenologia, Mudança no uso da terra, Biomassa.

1. Introdução

A fragmentação e a perda de habitat nas florestas tropicais são hoje as ameaças mais diretas à diversidade biológica (Fahrig, 2003, Gesit e Lambin, 2002, Gibbs *et al.*, 2010). Essas atividades antrópicas aceleram a mudança climática que estamos vivenciando hoje, causando mudanças na composição da diversidade biológica. As florestas tropicais são ecossistemas caracterizados por sua alta diversidade biológica, considerada a mais produtiva, que fornece serviços como a reciclagem de carbono e água e a regulação do clima. Dada a crescente perda de habitat e a mudança climática no uso da terra, esses fatores correm o risco de se tornarem insubstituíveis sem um manejo adequado e de maneira sustentável (Myers, 1991, Geist e Lambin, 2002, Gibbs, *et al.*, 2010). A América Latina é uma das regiões com maior taxa de perda de florestas tropicais, com o sul do México e o norte da Guatemala apresentando as maiores taxas de desmatamento nas últimas décadas (Mendoza e Dirzo, 1999, Hayes, Sader e Schwartz, 2002, Wassenaar e outros, 2007, Díaz-Gallegos, Mas, Velázquez, 2010, Aide e outros, 2013).

Os indicadores biológicos permitem avaliar o estado e a função dos ecossistemas ao longo do tempo, usando indicadores como plantas, fungos e animais (Noss, 1990, Pearson, 1994, Lauwton, e outros 1998, Pearman e Weber, 2007). Dos táxons com maior diversidade nesses ecossistemas estão os fungos, que fornecem uma série de serviços ecossistêmicos como: regulação do clima, assistência na produção primária, degradação de material vegetal, reciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo (Swift, 1982). Dighton, 2003; Tlalka *et al.*, 2008). Apesar

de sua importância, os fungos não são utilizados hoje como indicadores biológicos, principalmente devido à dificuldade taxonômica em sua determinação. No entanto, existem grupos que têm uma função específica no ecossistema, como é o caso daqueles pertencentes a família Marasmiaceae, que é um componente importante das florestas tropicais, sendo os grupos mais numerosos da ordem Agaricales. Eles são principalmente decompositores, contribuindo assim substancialmente para o processo de reciclagem de carbono, uma vez que a serapilheira representa um volume considerável nesse ecossistema (Singer, 1979; Hawksworth e Colwell, 1992; Cannon e Kirk, 2007; Braga-Neto, *et al.*, 2008). No entanto, apesar de sua importância funcional neste ecossistema, a resposta dos macrofungos a perturbações antrópicas e mudanças climáticas tem sido pouco estudada (Morris e Robertson, 2005, Lodge *et al.*, 2008). Da mesma forma, ectomycorrizas assegurar a estabilidade das florestas, porque a sua função principal é aumentar o crescimento da planta através do aumento da produção de água e nutrientes, bem como de manutenção e maturação de vegetação (Peterson *et al.*, 2004). Por outro lado, vários estudos propõem que a fenologia é um indicador sensível de mudanças climáticas recentes, no entanto, a resposta fenológica a essas mudanças não é compartilhada pelos membros de uma comunidade. Para os fungos, os eventos fenológicos incluem a formação de basidiomas e o crescimento vegetativo das hifas (Moore *et al.*, 2008). Este último evento dificulta a realização de estudos fenológicos com fungos, uma vez que são geralmente encontrados sob o solo ou outros substratos, sendo os basidiomas geralmente utilizados para esse fim (Büntgen *et al.*, 2012). Portanto, documentar a diversidade de grupos funcionais e avaliar sua resposta à mudança no uso da terra, bem como as variáveis microclimáticas, tem sido uma das abordagens durante a última década da equipe de pesquisa. Neste sentido, o presente trabalho apresenta uma compilação dos diferentes trabalhos realizados neste período em diferentes ecossistemas da Guatemala e a resposta dos macrofungos a diferentes condições climáticas e atributos de vegetação e paisagem. Isso, a fim de avaliar o potencial de indicadores de qualidade de habitat e mudança climática, para que possam ser usados como uma medida indireta dos processos de reciclagem e saúde dos ecossistemas.

2. Material e Métodos

2.1. Áreas de estudo

Selva, Ecoregion Lachuá, Alta Verapaz, Guatemala: A ecoregião de Lachuá está localizada no município de Cobán, Alta Verapaz, faz parte da verdadeira floresta correaia, com clima quente e húmido em que a temperatura média anual é de 30 ° C (no máximo de 41 ° C e um mínimo de 15 ° C), humidade relativa anual atinge 91,02%, e a estação chuvosa se estende ao longo do ano com uma precipitação média anual de 3.000 mm. (CONAP, 2003).

2.2. Cloud Forest, Biótopo para a conservação do Quetzal, Baja Verapaz, Guatemala

O Biótopo Universitário para a Conservação do Quetzal (BUCQ), parte da Sierra de las Minas, está localizado entre os municípios de Salamá e Purulhá, Baja Verapaz. Essa floresta nublada tem temperatura média de 19,49 ° C, umidade relativa de 90,7% e precipitação média anual de 2.069,8 mm (CECON, 2010).

2.3. Floresta Seca, Sanarate, El Progreso, Guatemala

As florestas secas são caracterizadas por uma sazonalidade muito acentuada, durante a estação seca as árvores perdem a folhagem, recuperando-a durante a estação chuvosa. Os dados foram obtidos na fazenda privada La Cureña em San Juan Village, Sanarate, El Progreso.

2.4. Resposta de macrofungos degradadores à perda de habitat e configuração da paisagem em Selva.

Uma análise da resposta de 6 espécies da família Marasmiaceae foi realizada; *Caripia montagnei* (Berk.) Kuntze, *Gymnopus neotropicus* (Singer) J.L. Mata, *Marasmiellus volvatus* Singer, *Marasmius helvolus* Berk., *Marasmius tageticolor* Berk. e *Trogia cantharelloides* (Berk ex Sacc.), em relação ao habitat tipo (floresta, floresta secundária, culturas perenes e áreas abertas) durante 2004 e 2011 (Quezada, 2005, Quezada *et al.*, 2013.), tamanho e forma do remanescente (López, 2009) e diferentes condições da paisagem (Quezada *et al.*, 2013). A

partir do banco de dados de coleção do herbário da BIGU fungos - USSG digitalizadas em Microsoft Excel[®], a escolha das frequências das espécies de Marasmiaceae coletadas na Ecorregião Lachuá desde 2004. Foi analisados os tipos de hábitat, os quais foram agrupados em quatro tipos: floresta (SE), floresta secundária (BS), cultura de sombra permanente (PC) e áreas abertas (AA).

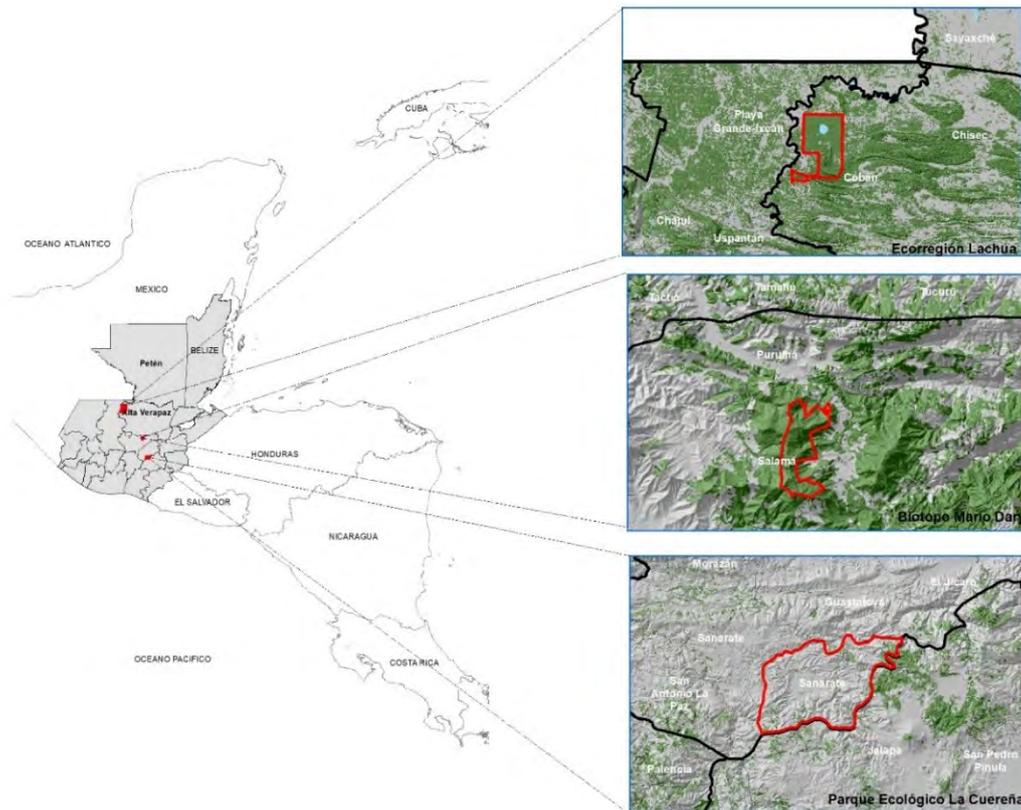


Figura 1. Localização das áreas de estudo

As demais características foram analisadas para as mesmas propostas por López (2009): grande quadrado (CG), pequeno quadrado (CP), grande retângulo (RG), pequeno retângulo (RP). Para avaliar a paisagem, apenas a cobertura florestal por paisagem foi considerada (PL1=100, PL2= 98%, TZE= 42%, UBV = 65%, FER=85%, PRO=22%; PDC=20%; SLL=32% Quezada *et al.*, 2013). Além disso foram selecionadas variáveis físicas Quezada (2005), Lopez (2009) e Quezada *et al.*, 2013) que relatam a frutificação de basidiomas: serapilheira, porcentagem de luz por habitat, porcentagem de luz no remanescente e cobertura de árvores por paisagem. A frequência relativa das espécies selecionadas foi plotada em relação ao tipo de habitat, tamanho e forma do remanescente e da paisagem. A frequência relativa das espécies selecionadas foi representada graficamente em relação ao tipo de habitat, tamanho e forma do remanescente e da paisagem. Análise de escalonamento multidimensional foi utilizada NMDS para verificar a distribuição de tipo de habitat de espécies 2004 e 2011, o tamanho e a forma do restante, e composição da paisagem (Kindt e Coe, 2005). Subsequentemente, regressões lineares simples foram realizadas com as mesmas variáveis, com a subsequente avaliação das hipóteses (Kutner, *et al.*, 2005). Finalmente, regressões lineares simples foram realizadas para avaliar o efeito da porcentagem de luz por tipo de habitat, porcentagem de luz por remanescente e cobertura de árvores por paisagem. O Critério de Informação de Akaike (Akaike Information Criterion) foi usado para selecionar os modelos que melhor se ajustam aos dados (Burnham e Anderson, 2002, Crawley, 2006, Tsujino *et al.*, 2009). Os programas Microsoft Office Excel 2010[®] e R 3.0.2 (pacotes MASS, CAR e VEGAN) foram usados para processar as informações (R Development Core Team, 2011).

2.5. Resposta de macrofungos à estrutura da vegetação e variáveis microclimáticas na Floresta Nublada

Os resultados de Papa (2015) são apresentados para aquelas coletas de cogumelos realizadas uma vez por mês durante a estação chuvosa (junho-outubro) de 2014 em trechos longitudinais de 50 x 20 m², localizados em cinco altitudes diferentes (1700-2100 masl) separadas umas das outras por uma distância de 50 m. Dentro de cada transecto foram estabelecidas cinco subparcelas circulares de 2,5 m de raio, espaçadas uma da outra a cada 12,5 m. A biomassa dos corpos frutíferos foi obtida pela pesagem de cada um em uma balança digital, considerada uma medida de produtividade. Herrera (2017) dá continuidade ao estudo de Pope (2015), incorporando o uso de registradores de temperatura e umidade, para avaliar a fenologia em quatro transectos. Coletas de fungos Agaricomycotina foram realizadas com dois dias durante os meses de Julho a Setembro de 2015. Herrera (2017) registou a data e a presença de cada fungo, também o número de basidiomas recolhidos em cada amostragem de toda as espécies de fungos. A média das medidas microclimáticas dos dois dias anteriores a cada coleta foi realizada para determinar sua relação com a formação de basidiomas.

Papa (2015) avaliou dados sobre a frequência relativa de espécies de fungos ectomicorrízicos em cada um dos transectos e a biomassa relativa dos fungos em cada local. Da mesma forma, foram obtidos dados sobre a frequência de espécies arbóreas, a ETA média de cada espécie por transecto, a altura e o diâmetro do dossel. Análises de agrupamento hierárquico e NMDS foram realizadas para avaliar mudanças na composição espacial dos fungos e sua biomassa e as espécies arbóreas da área. Ao NMDS de frequência de fungos micorrízicos e de biomassa foi adicionada a análise de envfit com os dados de frequência e estrutura da vegetação. Para avaliar a fenologia, Herrera (2017) obteve uma matriz de distância usando os dados de densidade dos basidiomas de cada família, em seguida, uma NMDS foi feita usando a distância de Bray-Curtis. Posteriormente, foram realizados testes de correlação de Pearson para determinar a relação das variáveis ambientais com a densidade dos basidiomas. Por fim, foram realizadas regressões lineares com as famílias dos macrofungos selecionadas para descrever sua relação com as variáveis microclimáticas. Para estas análises estatísticas utilizamos o programa estatístico R e os pacotes estatísticos MASS e VEGAN (R Core Team, 2017).

2.6. Resposta dos macrofungos à estrutura da vegetação e às variáveis microclimáticas na Floresta Seca

Hernandez (2019) realizou o primeiro estudo macrofungos em Floresta seca, visando a resposta para a estrutura e composição de variáveis de vegetação e de microclima através de uma luz adicional de temperatura e humidade. Para isso, o autor estabeleceu nove parcelas de 20 x 50 m. Amostragens macrofungos foram realizadas a cada três dias durante a estação chuvosa (abril a agosto de 2017), sendo realizadas 26 - 27 amostragens por parcela. Para as análises, utilizou-se a frequência relativa das espécies macrofúngicas e os dados de composição e estrutura da vegetação para cada uma das parcelas. Posteriormente, a análise da alteração na composição espaço-temporal das espécies macrofúngicas foi realizada por meio de um agrupamento hierárquico e gerenciamento de NMDS. Nesta última análise, a função Envfit juntou-se relacionar com riqueza macrofungos variando estrutura e composição da vegetação (rico, abundante e DAP e altura) e microclima (temperatura ambiente variáveis, humidade relativa e luz), que ajustam vetores ou fatores ambientais em uma ordem (Zelený e Schafers, 2011). Ambas análises foram realizadas utilizando o pacote VEGAN, no programa R, versão 3.5.2.

3. Resultados

3.1. Resposta de macrofungos degradadores à perda de habitat e configuração da paisagem em Selva.

As frequências relativamente mais elevadas de espécies reportadas na selva, enquanto florestas secundárias e cultura de sombra permanente de baixa frequência de espécies e em áreas abertas, apenas *G. neotropicus* e *T. cantharelloides* presente uma vez (Figura 2a, 2c). Os remanescentes florestais não apresentam diferença entre as frequências das espécies (Figura 2e) e as paisagens com menor cobertura possuem apenas três espécies e a menor frequência (Figura 2g). As análises de gestão NMDS têm uma tendência de espécies distribuídas em habitats cobertura de árvore (2b, 2d), a forma e tamanho do restante não manifestam qualquer padrão (Figura 2f) significativa, apenas os remanescentes de tamanho menor estão mais longe do agrupamento das espécies. Nas paisagens, observa-se que as espécies estão agrupadas naquelas que apresentam o maior percentual de cobertura de árvore (Figura 2g). De acordo com as quatro regressões lineares feitas com a frequência de espécie para cada

uma das variáveis avaliadas e considerado tipo de habitat (2004: AIC = 115,85, β LUZ = 0,238; 2011: AIC = 93166, β LUZ = 0,17) observa-se que os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e ausência de valores extremos. Os valores de R^2 ajustados mostraram que as regressões que consideram o tipo de habitat explicam entre 17 e 23% da variação observada (Tabela 1). Dezoito regressões mais simples de que as regressões lineares foram obtidos consideraram a porcentagem de luz do tipo de habitat (2004) (AIC = 22336, β LUZ = 0,600), a porcentagem de luz da floresta remanescente (AIC = 14753, β LUZ = 0,936) e porcentagem de cobertura de árvores de paisagem (AIC = 49570, β LUZ = 0,582) para *M. helvolus*, e a porcentagem de luz tipo de habitat (AIC = 9621, β LUZ = 0,879) para *T. cantharelloides* pressupostos de normalidade, homocedasticidade e ausência de valores extremos. Os valores de R^2 obtidos para *M. helvolus* mostraram que a regressão que considera a porcentagem de luz explica 60% da variação observada, da mesma forma, a regressão da luz média explica 93% e a regressão usando a cobertura arbórea explica 58% da variação observada. Isto mostra que *M. helvolus* é uma espécie sensível a mudanças no tipo de habitat, tamanho e forma do remanescente e tipo de paisagem. Por outro lado, a regressão da luz média explica 87% da variação observada para a presença de *T. cantharelloides*.

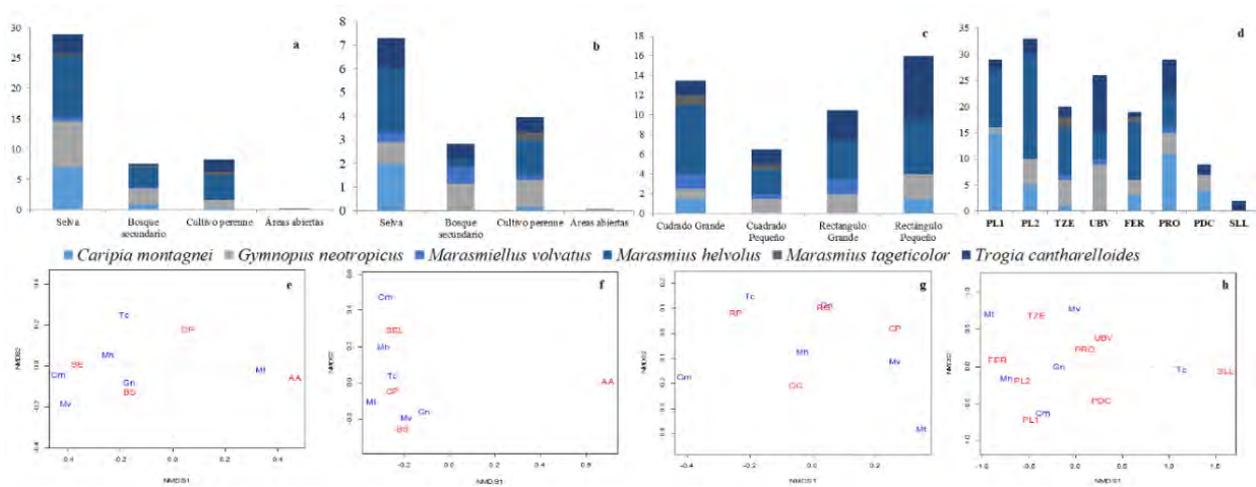


Figura 2. A-D Frequência relativa de seis espécies de fungos da família Marasmiaceae em relação ao tipo de habitat em 2004 (a) e 2011 (c); forma e tamanho do remanescente em 2005 (e); e tipo de paisagem (g) na Ecorregião de Lachuá. E-G Análise Multidimensional Não-Métrica de Escalonamento (NMDSs) para a frequência relativa de seis espécies de fungos da família Marasmiaceae em relação ao tipo de habitat em 2004 (b) e 2011 (d); forma e tamanho do remanescente em 2005 (f); e tipo de paisagem (h) na Ecorregião de Lachuá.

Tabela 1. Regressões lineares simples para a frequência relativa de seis espécies de fungos da família Marasmiaceae em relação ao tipo de habitat (Quezada, 2005); remanescente (López, 2009) e paisagem (Quezada *et al.*, 2013).

Indicador	Ano	Variável dependente	Variável Predictora	R^2 ajustado	Valor p	Parâmetro estimado	Erro padrão	AIC
Habitat	2004	frequência de espécies	Tipo de habitat	0.238	0.03 ^b	4.256	1.388	115.85
Remanescente	2005	frequência de espécies	Forma e tamanho	-0.03	0.52	38.501	19667	93.163
Habitat	2011	frequência de espécies	Tipo de habitat	0.17	0.07 ^a	2.282	0.863	93.166
Paisagem	2011	frequência de espécies	Paisagem	-0.01	0.50	3.167	1.867	291.34

a. nível de significância $p < 0,01$ b. nível de significância $p < 0,05$

3.2. Influência da estrutura da vegetação e variáveis microclimáticas na Floresta Nublada

Papa (2015) coletou um total de 134 espécimes correspondendo a 82 morfoespécies e 4 espécies, *Lactarius indigo* L., *Laccaria major* G.M. Mueller, *Calostoma cinnabarina* Desv. e *Leotia lubrica* (Scop.) Pers, que representa uma cobertura de amostragem de 0,163. As famílias que apresentaram maior riqueza foram Russulaceae, Cortinariaceae e Boletaceae. A composição dos fungos mostrou uma baixa relação com a estrutura da vegetação.

Os pontos p3, p4 e p9 apresentaram relação com o diâmetro da copa das árvores ($r^2 = 0,307$, $p = 0,29$). Estes pontos apresentam os diâmetros das copas das árvores menores dos demais. A frequência ($r^2 = 0,05$, $p = 0,8$), estatura ($r^2 = 0,03$, $p = 0,9$) e diâmetro à altura do peito ($r^2 = 0,07$, $p = 0,77$) não apresentaram forte relação com a frequência dos fungos (Figura 3a).

Tabela 2. Regressões lineares simples para a frequência relativa de seis espécies de fungos da família Marasmiaceae em relação à porcentagem de luz por tipo de habitat (Quezada, 2005); porcentagem de luz no remanescente (López, 2009); cobertura de árvores por paisagem (Quezada *et al.*, 2013).

Indicador	Ano	Variável dependente	Variável Predictora	R2 ajustado	Valor p	Parâmetro estimado	Erro padrão	AIC
Tipo de habitat	2004	<i>C. montagnei</i>	Luz *	0.143	0.345	-2.149	1.754	23.557
Remanescente	2005	<i>C. montagnei</i>	Prom luz	0.764	0.081	0.912	0.278	13.192
Paisagem	2011	<i>C. montagnei</i>	Cobertura	0.079	0.513	4.441	6.390	54.105
Tipo de habitat	2004	<i>G. neotropicus</i>	Luz *	0.193	0.320	-2.228	1.701	23.309
Remanescente	2005	<i>G. neotropicus</i>	Prom luz	0.294	0.629	-0.274	0.486	17.653
Paisagem	2011	<i>G. neotropicus</i>	Cobertura	0.160	0.861	0.614	3.368	43.860
Tipo de habitat	2004	<i>M. volvatus</i>	Luz *	-0.040	0.446	-0.170	0.181	5.395
Remanescente	2005	<i>M. volvatus</i>	Prom luz	-0.464	0.844	0.134	0.601	19.346
Paisagem	2011	<i>M. volvatus</i>	Cobertura	-0.005	0.364	-0.576	0.587	15.906
Tipo de habitat	2004	<i>M. helvolus</i>	Luz *	0.600	0.143 a	3.536	1.506	22.336
Remanescente	2005	<i>M. helvolus</i>	Prom luz	0.936	0.021 b	2.264	0.338	14.753
Paisagem	2011	<i>M. helvolus</i>	Cobertura	0.582	0.016 b	49.570	4.813	49.570
Tipo de habitat	2004	<i>M. tageticolor</i>	Luz *	0.247	0.294	-0.158	0.112	1.570
Remanescente	2005	<i>M. tageticolor</i>	Prom luz	0.053	0.392	0.334	0.308	14.009
Paisagem	2011	<i>M. tageticolor</i>	Cobertura	-0.165	0.946	-0.063	0.908	22.897
Tipo de habitat	2004	<i>T. cantharelloides</i>	Luz *	0.879	0.041	-1.468	0.307	9.621
Remanescente	2005	<i>T. cantharelloides</i>	Prom luz	-0.471	0.862	0.267	1.353	25.835
Paisagem	2011	<i>T. cantharelloides</i>	Cobertura	-0.147	0.761	-1.331	4.185	47.332

a. Nível de significância $p < 0,01$ b. Nível de significância $p < 0,05$ * Resultados na variável transformada

A biomassa dos basidiomas foi maior em um dos pontos com maior altitude (p2), seguido por p11, p9 e p4. A biomassa pode ser formada em dois grupos, um com alta similaridade conformado pelos sítios p3, p4, p6 e p9. Não houve evidência de separação dos locais por altitude (figura 3b). Uma relação entre a biomassa e a estrutura da vegetação foi evidenciada. A relação mais forte foi observada com a frequência das plantas ($r^2 = 0,382$, $p = 0,2$), seguida pela altura média ($r^2 = 0,319$, $p = 0,25$). Por outro lado, o diâmetro à altura do peito (DAP) e o diâmetro da coroa foram as variáveis que apresentaram a menor relação ($r^2 = 0,129$, $p = 0,6$ e $r^2 = 0,2$, $p = 0,45$, respectivamente). Os locais de maior altitude não apresentaram relação com a estrutura (Figura 3c).

Para a avaliação da fenologia, Herrera (2017) coletou 228 amostras de fungos que compreendem um total de 4 espécies (*Lactarius índigo* L., *Hygrocybe cantharellus* (Schwein.) Murril, *Marasmius siccus* Schwein Ex. P. e *Laccaria major* G.M. Mueller) e 116 morfoespécies representando 18 famílias do clado Agaricomycotina. As famílias Russulaceae, Cortinariaceae, Marasmiaceae e Mycenaceae foram as mais ricas. Os sítios A e B tiveram o maior número de basidiomas produzidos durante a amostragem, com um total de 399 e 229 basidiomas, respectivamente. Por outro lado, os sites C e D apresentaram uma produção muito baixa, com um total de 63 e 35 basidiomas, respectivamente. Os locais de maior altitude (A e B) tinham uma faixa de temperatura mais fria, enquanto os locais de menor altitude (C e D) tinham uma faixa de temperatura 0,001, mas possui uma fraca relação com a humidade relativa ($r = 0,10$, $p = 0,074$, (Figura 4b). Constatou-se também que das 18 famílias

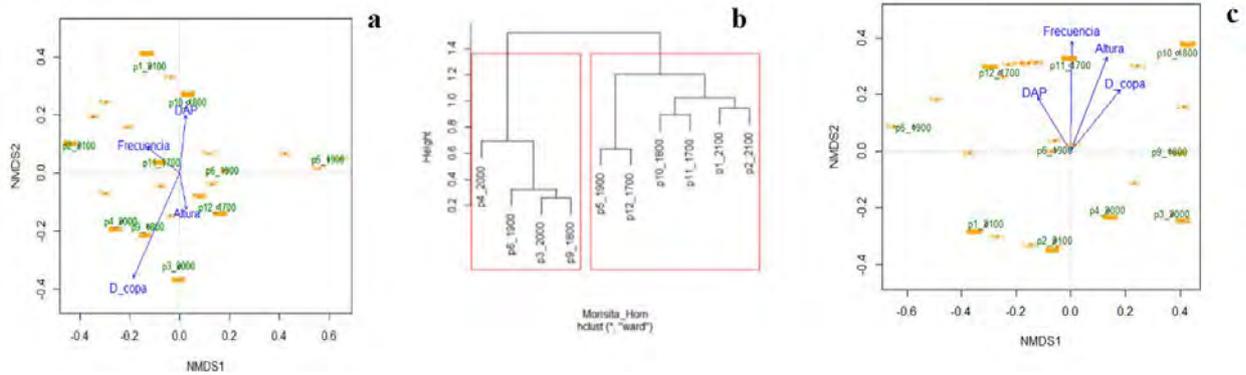


Figura 3. (a) Análise de classificação por NMSD (stress 0.132) baseada na frequência de fungos com os vetores que indicam sua relação com a estrutura da vegetação.

Frequência = frequência média de plantas por transecto, DAP = diâmetro à altura média do peito, Altura = altura média, D_copa = diâmetro médio da copa das árvores, (b) Análise hierárquica de agrupamentos baseada em dados de biomassa (Índice de Morisita-Horn, método de distância mínima de Ward). (c) Análise de manejo de NMSD (estresse 0,139, $r^2 = 0,85$) com dados de fungos de biomassa com vetores que indicam sua relação com a estrutura da planta.

amostradas a família Hygrophoraceae apresenta maior correlação com a temperatura ($r = -0,69$, $p = 7,551e-10$). A família Hygrophoraceae apresentou uma relação inversa com a temperatura (Figura 5c), indicando que a abundância de basidiomas diminui à medida que a temperatura do local aumenta.

3.3. Influência da estrutura da vegetação e variáveis microclimáticas na Floresta Seca

Hernandez (2019) registou na estação chuvosa de 2017 para o centro cureña ecológico, um total de 594 amostras de Basidiomycota, distribuídas em 36 famílias, 74 géneros e 181 morfoespécie. As famílias que apresentaram maior riqueza foram Agaricaceae (53), Marasmiaceae (29) e Polyporaceae (16). Análise gestão NMSD e correlações Envfit com base na frequência absoluta de espécies macrofungos (estresse = 0,133868, $R_{adj} = 0,854$) e a estrutura de dados variável e composição de vegetação e variáveis do microclima formam três grupos. Variáveis de maior incidência apresentada na presença de macrofungos são riqueza em espécies de plantas médios DAP (Figura 5), a incidência inferior e altura média e variáveis climáticas abundância média. A vegetação apresentou semelhante ao macrofungos padrão (Figura 5). As principais variáveis que determinam este agrupamento, estão composição variável (riqueza e abundância) seguido estrutura (altura média e média DAP). As variáveis ambientais também apresentam menor incidência (Figura 5). Portanto, a composição e estrutura da vegetação têm alta incidência na composição de macrofungos.

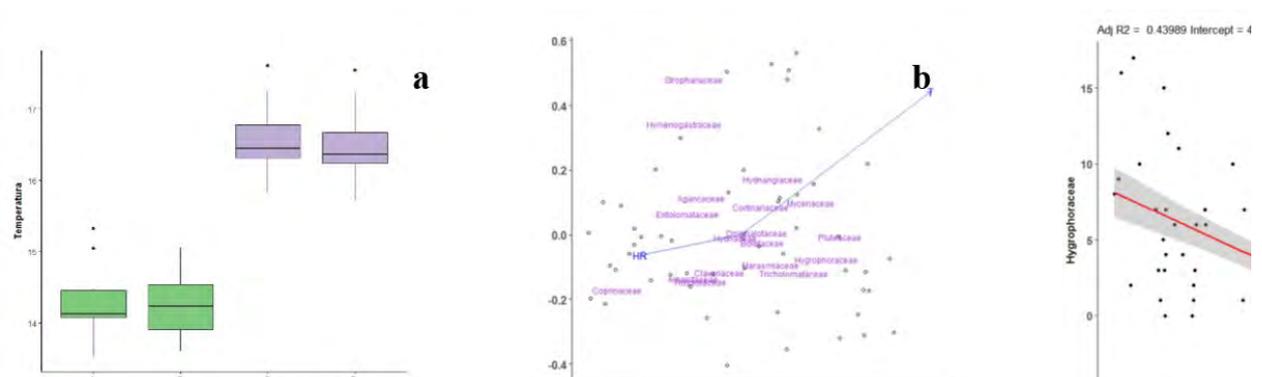


Figura 4. (a) Distribuição dos dados de temperatura nos quatro locais de coleta durante o período de amostragem (b) NMSD Os vetores representam a relação entre a abundância de basidiomas e as variáveis ambientais. O comprimento do vetor indica a correlação entre a variável ambiental (T = temperatura, UR = umidade relativa) e a abundância de basidiomas. O vetor de temperatura apresentou um valor de $p < 0,05$, enquanto o vetor de umidade relativa obteve um valor $p > 0,05$. (b) Modelo de regressão linear da abundância de basidiomas de Hygrophoraceae com temperatura.

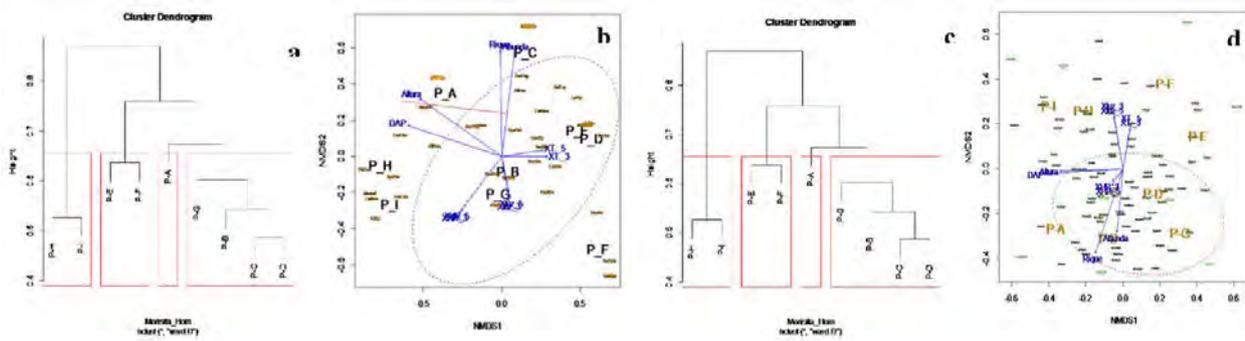


Figura 5. Características das parcelas avaliadas em relação às espécies macro-fúngicas e às variáveis avaliadas. a) Análise do agrupamento hierárquico dos locais de coleta (Morisita Horn Index, método de distância mínima de Ward) b) Análise gerencial NMDS (stress 0,1333681, $R_{aj} = 0,854$) com base na frequência relativa das morfoespécies de macrófungos. As variáveis de estrutura da vegetação e microclimas representados por vetores azuis c. Parcelas agrupadas hierarquicamente de espécies vegetais d) Análise de manejo NMDS (stress = 0.07955661) para vegetação.

4. Conclusões

O presente estudo demonstra o efeito da perda de habitat e mudança no uso da terra em fungos em decomposição de serapilheira. Da mesma forma, a influência do estado de conservação das florestas para a manutenção do microclima é evidente, bem como a frutificação das espécies degradadoras e micorrizas. Das atuais ameaças da diversidade biológica, a perda de habitat é a mais evidente e, com ela, a aceleração das mudanças climáticas. Portanto, considerando que as florestas tropicais são ecossistemas que dependem de interações bióticas para manter sua estabilidade, vale a pena incorporar fungos em estratégias de conservação, uma vez que estes podem fornecer informações sobre a velocidade de reciclagem de nutrientes em o solo e cadeias tróficas em ambientes florestais.

5. Referências

- Aide, T., Clark, M., Grau, H., López-Carr, D., Levy, M., Redo, D. 2013. Deforestation and Reforestation of Latin America and the Caribbean (2001-2010). *Biotropica*, 45, 262–271.
- Braga-Neto, R., Costa, R., Magnusson, W., Zuquim, G., Volkmer, C. 2008. Leaf litter fungi in a Central Amazonian forest: the influence of rainfall, soil and topography on the distribution of fruiting bodies. *Biodiversity and Conservation*, 17, 2701-2712.
- Burnham, K., Anderson, D. 2002. *Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach*. New York: Springer. 488 p
- Büntgen, U., Kausserud, H., Egli, S. 2012. *Linking climate variability to mushroom productivity and phenology*. *Front Ecol Environ*, 10 (1), 14-19.
- Cannon, P., Kirk, P. 2007. *Fungal families of the world*. United Kingdom: CAB International. Wallingford, *United Kingdom*, 456 p.
- CECON. 2010. *Plan Maestro Biotopo para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera” (BUCQ) 2010-2014*. Guatemala: CONAP, USAC, Jade.
- CONAP. 2003. *Plan Maestro del Parque Nacional Laguna Lachuá*. 2004-2009.
- Crawley, M. 2006. *The R Book*. United Kingdom: John Wiley e Sons.
- Díaz-Gallegos, J., Mas, J., Velázquez, A. 2008. Monitoreo de los patrones de deforestación en el Corredor Biológico Mesoamericano, México. *Interciencia*, 33, 882–890.
- Dighton, J., Mason, P. 1985. *Mycorrhizal dynamics during forest tree development*. In D. Moore, L. Casselton, D. Wood e J. Frankland (Eds.). *Developmental Biology of Higher Fungi* (pp.117-139). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Didham, R., Lawton, J. 1999. Edge structure determines the magnitude of changes in microclimate and vegetation structure in tropical forest fragments. *Biotropica*, 31(1), 17-30.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution, and Systematics*, 34, 487-515.
- Gibbs, H., Ruesch, A., Achard, F., Clayton, M., Holmgren, P., Ramankutty, N. 2010. Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 16732-16737.
- Geist, H., e Lambin, E. 2002. Proximate causes and underlying driving forces of tropical deforestation. *BioScience*, 52, 143-150.
- Hawksworth, D., Colwell, R. 1992. Microbial Diversity: biodiversity amongst micro-organisms and its relevance. *Biodiversity and Conservation*, 1, 221-226.
- Hayes, D., Sader, S., Schwartz, N. 2002. Analyzing a forest conversion history database to explore the spatial and temporal characteristics of land cover change in Guatemala's Maya Biosphere Reserve. *Landscape Ecology*, 17, 299-314.
- Hernández, B. 2019. *Diversidad de macrohongos del bosque tropical estacionalmente seco, La Cureña, San Juan, Sanarate en relación con características de la vegetación y variables microclimáticas*. Guatemala. (Tesis de Biólogo).F.57. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Herrera, J. 2017. *Efecto de la humedad y temperatura sobre los patrones fenológicos de los hongos Agaricomycotina en el Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz*. (Tesis de Biólogo).F.44. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Kutner, M., Nachtsheim, C., Neter, J., Li, W. 2005. *Applied Linear Statistical Models*. New York: McGraw-Hill.1358pp
- López, R. 2009. *Distribución de macrohongos (Agaricomycetes) en remanentes de bosque de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna de Lachuá, Cobán Alta Verapaz* (Tesis de Biólogo). F.53. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Lodge, J., McDowell, W., Macy, J., Ward, S. K., Leisso, R., Campos, K. 2008. *Distribution an Role of Mat-Forming Saprobic Basidiomycetes in a Tropical Forest*. In L. Boddy, J. Frankland, e P. van West (Eds.). *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. 197-209. London: Elsevier.
- Mendoza, E.,Dirzo, R. 1999. Deforestation in Lacandonia (southeast Mexico): evidence for the declaration of the northernmost tropical hot-spot. *Biodiversity and Conservation*, 8,661-1641.
- Moore, D., Gange, A., Gange, E., Boddy, L. 2008. *Fruit bodies, their production and development in relation to enviroment*. In L. Boddy, J. Frankland, e P. van West (Eds.). *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes* 79-103 London: Elsevier.
- Morris, S., Robertson, G. 2005. *Linking function between scales of resolution*. In J. Dighton, P. Oudemans, e J. White (Eds.). *The Fungal Community* (pp. 13-26). New York: Marcel Dekker.
- Myers, N. 1991. Tropical Forest: present status and future outlook. *Climatic Change*, 19, 3-32.
- Noss, R. F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation biology*, 4(4), 355-364.
- Papa, M.E. 2015. *Relación de la frecuencia de hongos ectomicorrícicos con la estructura y composición de especies arbóreas en el Biotopo Universitario para la conservación del Quetzal "Mario Dary Rivera"*. (Tesis de Biólogo). F.73. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Pearson, D. L.1994. Selecting indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1311), 75-79.
- Peterson, L.R., Massicotte, H.B. & Melville, L.H. 2004. *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. Canada: NRC Research.
- Pearman, P. B., e Weber, D. 2007. Common species determine richness patterns in biodiversity indicator taxa. *Biological Conservation*, 138(1-2), 109-119.
- Quezada, M. 2005. *Análisis de la diversidad y distribución de Macrohongos (Ordenes Agaricales y Aphyllporales) en relación con los paisajes antropogénicos en la zona de influencia del Parque Nacional Laguna de Lachua, Cobán Alta Verapaz*.F.49 (Tesis de Biólogo) pg Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Quezada, M., Sunum, R. 2013. *Evaluación del género Marasmius Fr. como indicador del cambio climático en la Ecorregión Lachúa* (Informe FODECYT 57-2011). USAC, Guatemala.
- Quezada, L., Pérez-Silva, E., y Sunum, R. 2013. Macromicetos marasmiáceos como indicadores de calidad de hábitat en selvas tropicales. Capítulo de libro en Memorias en Extenso. X encuentro "Participación Mujer en la Ciencia". Centro de Investigaciones en Optica (CIO). ISBN: 978-607-95228-4-1. México.
- R Development Core Team. 2011-2017. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Obtenido el 03 de marzo de 2013, de <http://www.R-project.org/>.
- Singer, R., Araujo, I. 1979. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal Basidiomycetes in latosol-terra-firme rain forest and white podzol campinarana. *Acta Amazonica* 9, 25–41.
- Swift, M. 1982. *Basidiomycetes as components of forest ecosystems*. In J. Frankland, J. Hedger, J. Swift (Eds.). *Decomposer Basidiomycetes: their biology and ecology*. UK, Cambridge: Cambridge University Press.pg
- Tlalka, M., Bebb, D., Darrah, P., e Watkinson, S. 2008. *Mycelial Networks: Nutrient uptake, translocation an role in Ecosystems*. In L. Boddy, J. Frankland, e P. van West (Eds.). *Ecology of saprotrophic Basidiomycetes* (pp . 43-62). London : Elsevier.
- Tsujino, R., Sato, H., Imamura, A., Yumoto, T. 2009. Topography-emergence of fungal fruiting bodies in warm temperate evergreen broad-leaved forests on Yakushima Island, Japan. *Mycoscience*, 5, 388-399.
- Wassenaar, T., Gerber, P., Verburg, P., Rosales, M., Ibrahim, M., e Steinfeld, H. 2007. Projecting land use change in the Neotropics: The geography of pasture expansion into forest. *Global Environ Change*, 17, 86–104.
- Zelený, D., Schaffers, A. P. (2011). To good to be true: pitfall of using mean Ellenberg indicator values in vegetation analyses. *Journal of Vegetation Sciene*, 23 (3), 419-431. Doi: 10.1111/j.1654-1103.2011.01366.x

Descoloração *in vitro* e *in silico* de corante reativo pela lacase de fungo de Basidiomiceto

BALLAMINUT; Nara^{1,2}, COELHO, Glauciane Danusa³; MAIA, Rafael Trindade³; VITALI, Vera Maria Valle⁴; MATHEUS, Dácio Roberto^{1,5}

¹ Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo

² Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC

³ Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semi-árido, Universidade Federal de Campina Grande

⁴ Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo

⁵ Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do ABC

Email: naraballaminut@usp.br

Resumo

Corantes têxteis são compostos coloridos, classificados de acordo com o modo de fixação à fibra, sendo os reativos os mais expressivos no mercado mundial. Esses corantes formam ligações covalentes com as fibras dos tecidos, proporcionando tingimento estável. A maioria dos corantes reativos possui grupo cromóforo azo e antraquinona, geralmente são aniônicos e reconhecidos pela recalcitrância e alta solubilidade em água. Durante o banho de tingimento, parte do corante é descartada nos efluentes, assim faz-se necessária a remoção previamente ao despejo no ambiente. A aplicação de Basidiomicetos em tratamento de descoloração é promissora, pois esses têm um sistema enzimático ligninolítico extracelular e inespecífico, constituído por enzimas ligninolíticas e compostos de baixa massa molar, capazes de degradar diferentes compostos xenobióticos, incluindo corantes. Avaliou-se o efeito dos extratos enzimáticos, contendo lacase de *Peniophora cinerea*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes villosa* sobre a descoloração *in vitro* de CI Reactive Blue 222. Modelo teórico de lacase foi usado para compreender, *in silico*, as interações estabelecidas entre a enzima e o corante. Os extratos dos fungos descoloriram o corante em 2 horas de contato *in vitro*, tendo-se verificado correlação positiva entre a atividade de lacase e a descoloração. Isso demonstra que as lacases apresentam potencial para o tratamento de efluentes têxteis, associado a agilidade, visto que o tempo de retenção hidráulica foi inferior àquele comumente observado. Os testes *in silico* indicaram a ocorrência de interações de hidrogênio evidenciando que a lacase é capaz, não só de descolorir, mas também degradar o corante estudado.

Palavras-chave: Descoloração, Lacase, MnP, Idade fisiológica, Corante reativo diazo.

1. Introdução

Dentre os vários tipos de corantes têxteis existentes, a classe dos corantes reativos apresenta aplicação expressiva no mercado mundial, devido principalmente à ampla gama de tonalidades de cores, facilidade de aplicação e baixo consumo de energia durante o processo industrial. Estruturalmente, a maioria dos corantes reativos contém grupos azo e antraquinônicos, funcionalmente, esses corantes formam ligação química covalente com a fibra têxtil, o que proporciona estabilidade química para o tingimento. No entanto, os corantes reativos estão dentre os principais corantes aniônicos, que correspondem também aos mais problemáticos, por serem altamente solúveis em água e não serem removidos pelo tratamento convencional de efluentes. Esses corantes formam grupos vinil-sulfona, que durante o tingimento se ligam à fibra têxtil, embora essas ligações já estejam formadas, o grupo vinil-sulfona sofre hidrólise espontânea e, como os produtos dessa hidrólise não apresentam qualquer afinidade com as fibras, não formam ligação covalente, ficando dissolvidos no efluente de saída dessa etapa do processo (Zaharia e Suteu, 2012; Kyzas *et al.*, 2013). Assim, a remoção de corantes dos efluentes industriais é um dos problemas enfrentados pelo setor têxtil, devido principalmente à diversidade desses compostos, que contém grupos químicos diferentes, inviabilizando a aplicação de um procedimento único no tratamento desse tipo de efluente (Kunz *et al.*, 2002; Aguiar e Ferraz, 2011). Vários microrganismos, incluindo fungos, bactérias e algas, vem sendo avaliados na descoloração e na degradação de corantes sintéticos (Santos *et al.*, 2005; Işik e Sponza, 2007; Haroun e Idris, 2009; Ali, 2010;

Chequer *et al.*, 2013), contudo os fungos ligninolíticos apresentam vantagens, por produzirem mecanismo enzimático ligninolítico extracelular e inespecífico, capaz de catalisar a degradação de diferentes compostos xenobióticos, incluindo corantes (Bergsten-Torrallba *et al.*, 2009; Faraco *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2010; Bibi e Bhatti, 2012; Kalpana *et al.*, 2012; Pakshirajan e Kheria, 2012; Malachova *et al.*, 2013; Moreira-Neto *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013). O mecanismo ligninolítico desses fungos inclui as três enzimas principais Lignina Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), Peroxidase dependente do Manganês (MnP, EC 1.11.1.13) e Lacase (EC 1.10.3.2), todas com ação catalítica conhecida (Dong, 2009), que pode ser otimizada em tratamento de efluentes. A produção desse mecanismo ligninolítico pode ser induzida por compostos considerados indutores e pelo ajuste da concentração de fontes de carbono e nitrogênio. Ainda a adição de ácidos graxos ao meio de cultivo favorece a peroxidação de ácidos graxos insaturados, promovendo geração de radicais livres, como o radical peroxila ($\cdot\text{OOR}$), que apresenta elevado potencial de oxidação (Ten Have e Teunissen 2001; Hammel *et al.*, 2002; Srebotnik e Boisson, 2005; Arantes e Milagres, 2007; Aguiar e Ferraz, 2011) que pode melhorar o nível de descoloração de corantes.

Recentemente foi avaliada a capacidade de espécies de Basidiomicetos em descolorir o corante reativo antaquinônico CI Reactive Blue 19, sendo que *Peniophora cinerea*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes villosa* foram selecionados por apresentarem potencial biotecnológico para degradação desse corante têxtil em condição de alta salinidade e pH alcalino, associado a um tempo de retenção hidráulica reduzido (Neto *et al.*, 2011; Moreira-Neto *et al.*, 2013). Nesse trabalho buscou-se elucidar o envolvimento de lacases de Basidiomicetos na descoloração do corante CI Reactive Blue 19 por meio de estudos *in vitro* e *in silico*.

2. Metodologia

2.1. Basidiomicetos

Foram empregados os fungos *Peniophora cinerea* (CCIBt2541), *Pleurotus ostreatus* (CCIBt2347) e *Trametes villosa* (CCIBt2628), pertencentes à Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt). As culturas fúngicas foram mantidas em meio sólido BDA (Batata Dextrose Agar), sob refrigeração a $5 \pm 0,2$ °C.

2.2. Corante

O corante têxtil utilizado foi CI Reactive Blue 222 (Figura 1), obtido comercialmente pela Golden Tecnologia, avaliado em solução aquosa, e que foi preparado em temperatura ambiente com água deionizada.

2.3. Tratamento de descoloração

A descoloração *in vitro* de diferentes concentrações de corante (0,03%, 0,0003%, 0,00003%), por extratos fúngicos obtidos em diferentes idades fisiológicas, para identificar a concentração de corante e a idade fisiológica ótimas para promover os maiores valores de descoloração pelas enzimas extracelulares dos Basidiomicetos estudados.

2.4. Sistemas de Cultivo e Obtenção do Extrato Bruto

Os Basidiomicetos foram cultivados em meio líquido constituído de 0,049g/L CuSO_4 , 0,2g/L K_2HPO_4 , 0,05g/L MgSO_4 , 0,016g/L MnSO_4 , 1,2% de sacarose, como fonte de carbono, 0,1% de oxalato de amônio, como fonte de nitrogênio (Vitali *et al.* 2018), e 2,5% de emulsão de óleo de soja : Tween 20 (9:1, v:v) como fonte de ácido graxo insaturado (Matheus e Bononi, 2002). As fontes de ácido graxo foram adicionadas para estimular a peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas de oxigênio no meio de cultura. O meio líquido foi esterilizado por via úmida a 121 °C, durante 20 minutos. Após resfriamento, 5 discos de micélio ($\varnothing = 0,9\text{cm}$), constituído de micélio fúngico em fase exponencial de crescimento, cultivado em Batata Dextrose Ágar, contendo 1% de pó de serragem, foram inoculados e os frascos foram incubados a 28 ± 2 °C, por 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias. Após a incubação, o extrato bruto foi separado da biomassa por filtração a vácuo, seguido de centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 20 °C (Centrifuga EPPENDORF – Mod. 5804 R), conforme descrito por Ballaminut *et al.* (2009).

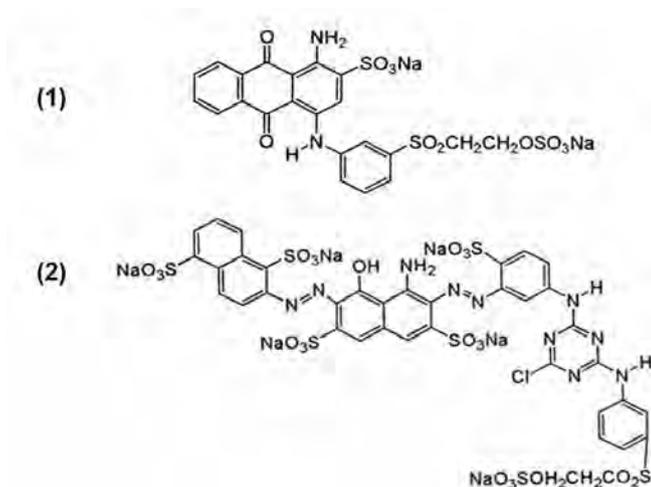


Figura 1. Estrutura molecular do corante CI Reactive Blue 222.

2.5. Determinação de Biomassa

Determinada por massa seca em termobalança (MARTE, ID50), à 105 °C por 40 minutos.

2.6. Determinações enzimáticas

Atividade de lacase foi determinada pela oxidação do ABTS, de acordo com Ballaminut e Matheus (2007), em que uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de substrato por minuto.

2.7. Descoloração *in vitro*

Em tubos de ensaio foram adicionados 10 μL da solução de corante nas três concentrações (0,03%, 0,0003%, 0,00003%) e 990 μL de extrato enzimático bruto. Os tubos foram incubados por 2 horas, a 28 ± 2 ° C. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100 ° C por 10 minutos, para inativação do complexo enzimático. A descoloração foi determinada pela variação de absorbância a 610 nm. O cálculo da descoloração foi realizado usando a equação descrita por Moreira-Neto *et al.* (2013). Como controle da ação enzimática utilizou-se extratos aquecidos a 100 ° C por 10 minutos em banho-maria.

2.8. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico Minitab[®] 17, em que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, sempre protegidas por análise de variância (ANOVA), com $\alpha \leq 0,1$. Os dados percentuais foram transformados conforme Vieira e Hoffmann (1989). A análise de covariância entre as atividades enzimáticas e a descoloração foi realizada pelo uso o coeficiente de correlação de Pearson (p), que varia de 0 a 1 para **correlação bem fraca** (0,00 a 0,19); **correlação fraca** (0,20 a 0,39); **correlação moderada** (0,40 a 0,69); **correlação forte** (0,70 a 0,89); **correlação muito forte** (0,90 a 1,00).

2.9. Simulação de *Docking Molecular*

Um modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* foi construído por meio da técnica de modelagem por homologia utilizando a sequência e o modelo cristalográfico da lacase obtidos nos banco de dados NCBI (AAR21094.1) e Protein Data Bank (PDB ID 2HRG), respectivamente por meio do servidor Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/>). O modelo foi validado pelo PROCHECK (gráfico de Ramachandran) e pelo ANOLEA. O servidor Ghecom (<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/ghecom/>) foi aplicado para a predição de sítios de ligação na estrutura da enzima. A estrutura secundária do ligante ReactiveBlue foi obtida no Pubchem, e a partir dela foi construída

a estrutura 3D e feita a otimização da geometria pelo software DiscoveryStudio. Os arquivos com as coordenadas atômicas (.pdb) foram enviados para simulação de docking molecular via servidor Patchdock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>), sendo selecionado o modo proteína-ligante com um agrupamento por RMSD de 1.5 angstroms. Os complexos obtidos foram analisados visualmente pelo software VMD – Visual Molecule Display.

3. Resultados e Discussão

Os três fungos avaliados produziram lacase, sendo que maiores valores de atividade de lacase foram produzidas por *P. cinerea*, aos 30 dias (821 U.L^{-1}), diferindo significativamente de *T. villosa* e *P. ostreatus* ($p = 0,000$). As máximas atividades de lacase *T. villosa* e *P. cinerea* foram, respectivamente, de 474 U.L^{-1} e 223 U.L^{-1} , após 14 dias de incubação, com diferença altamente significativa dos demais tempos avaliados ($p = 0,000$). Em estudo de descoloração de corante Poly-R 478 também foi observado que *Peniophora* sp. e *P. ostreatus* apresentaram maiores atividades de lacase em comparação com as demais espécies de Basidiomicetos (Alberts *et al.*, 2009), corroborando com o observado nessa pesquisa. Shankar e Shikha (2012), em estudo com *Peniophora* sp. observaram que a maior produção de lacases ocorreu após 22 dias de incubação, corroborando assim com os dados aqui apresentados, os quais mostraram maiores valores dessa atividade enzimática em períodos de incubação a partir dos 14 dias.

Na Figura 2 está apresentada a relação entre a produção de lacase e biomassa de *P. ostreatus*, *T. villosa* e *P. cinerea* durante os 30 dias de incubação em meio líquido, demonstrando que *P. ostreatus* apresentou a menor relação. Os maiores valores de atividade de lacase foram verificados para *P. cinerea* aos 14 dias de cultivo, enquanto *P. ostreatus* produziu os menores valores de lacase. A biomassa produzida nos cultivos dos fungos aumentou a partir do 7º dia de incubação, sendo maior entre 21 e 30 dias, com diferença altamente significativa dos demais tempos ($p = 0,000$). *T. villosa* e *P. cinerea* apresentaram maiores quantidades de biomassa, com mais de 30 g.L^{-1} , diferindo estatisticamente entre si e de *P. ostreatus* ($p = 0,000$), que produziu máxima biomassa de 23 g.L^{-1} , com crescimento ativo durante todo tempo de incubação. Ainda, *P. ostreatus* demonstrou melhor capacidade de crescimento quando comparado com Moreira-Neto *et al.* (2013), que observaram apenas $0,778 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa produzida por *P. ostreatus*, $0,96 \text{ g.L}^{-1}$ por *T. villosa* e $1,35 \text{ g.L}^{-1}$ por *P. cinerea*, aos 7 dias de incubação, com essas mesmas linhagens de Basidiomicetos em meio mínimo. Do mesmo modo, a linhagem de *P. cinerea* produziu $2,26 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa no estudo de Silvério *et al.* (2013), entretanto, essas espécies de fungos com a mesma idade fisiológica produziram 14, 26 e 21 g.L^{-1} de biomassa, respectivamente. Dessa forma, nota-se que elevada biomassa pode ser atribuída a adição da emulsão de óleo e Tween 20, que provavelmente favoreceu o aumento da biomassa fúngica durante cultivo.

A descoloração de CI Reactive Blue 222 não diferiu estatisticamente entre os extratos obtidos dos diferentes fungos ($p > 0,1$), nem entre os tempos de incubação avaliados ($p = 0,380$), exceto na maior concentração de corante (0,03%). Os maiores valores de descoloração foram verificados a partir dos extratos obtidos aos 30 dias de cultivo, nas menores concentrações de corante (0,0003% e 0,00003%), com diferença estatística dos demais tempos ($p < 0,05$). *P. cinerea* apresentou maior descoloração na menor concentração do corante (0,00003%) ($p = 0,000$). *P. ostreatus* e *T. villosa* apresentaram os maiores valores de descoloração na maior concentração de corante (0,03%) com probabilidade de 0,141 e 0,079, respectivamente, todos com extratos de 30 dias (Figura 3).

O tempo de incubação do Basidiomiceto também foi objeto de estudo de Ballaminut *et al.* (2014), que avaliaram a degradação de pentaclorofenol em solo por *Lentinus crinitus*, usando critérios qualitativos para seleção de idade fisiológica de inóculo. Quatro dos critérios citados por esses autores podem ser aplicados a esse estudo, são eles: maior atividade de lacase no tempo inicial do tratamento; maior biomassa; e maior de degradação. Considerando esses critérios, os extratos obtidos com 30 dias de incubação das três espécies de fungos foram adequados para a aplicação de tratamento de efluentes contendo o corante CI Reactive Blue 222. A análise de correlação entre a produção de lacase ($\text{U.g de biomassa}^{-1}$) em função da descoloração (% de descoloração/g de biomassa. L^{-1}) com o coeficiente de correlação de Pearson (p) e probabilidade (p) estão apresentados na Tabela 1. Correlação positiva foi verificada entre atividade de lacase de *P. cinerea* e a descoloração nas diferentes concentrações de corante avaliadas. Para *P. cinerea* só foi observada correlação positiva fraca, para a menor concentração de corante. Nas demais concentrações não foi evidenciada correlação entre a produção enzimática e a descoloração.

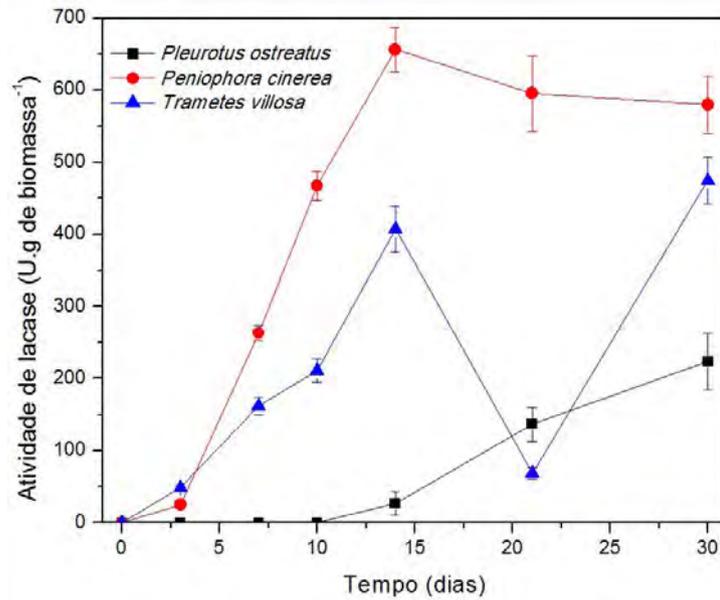


Figura 2. Relação entre a produção de lacase e biomassa de *P. ostreatus*, *T. villosa* e *P. cinerea* durante crescimento em meio líquido a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias.

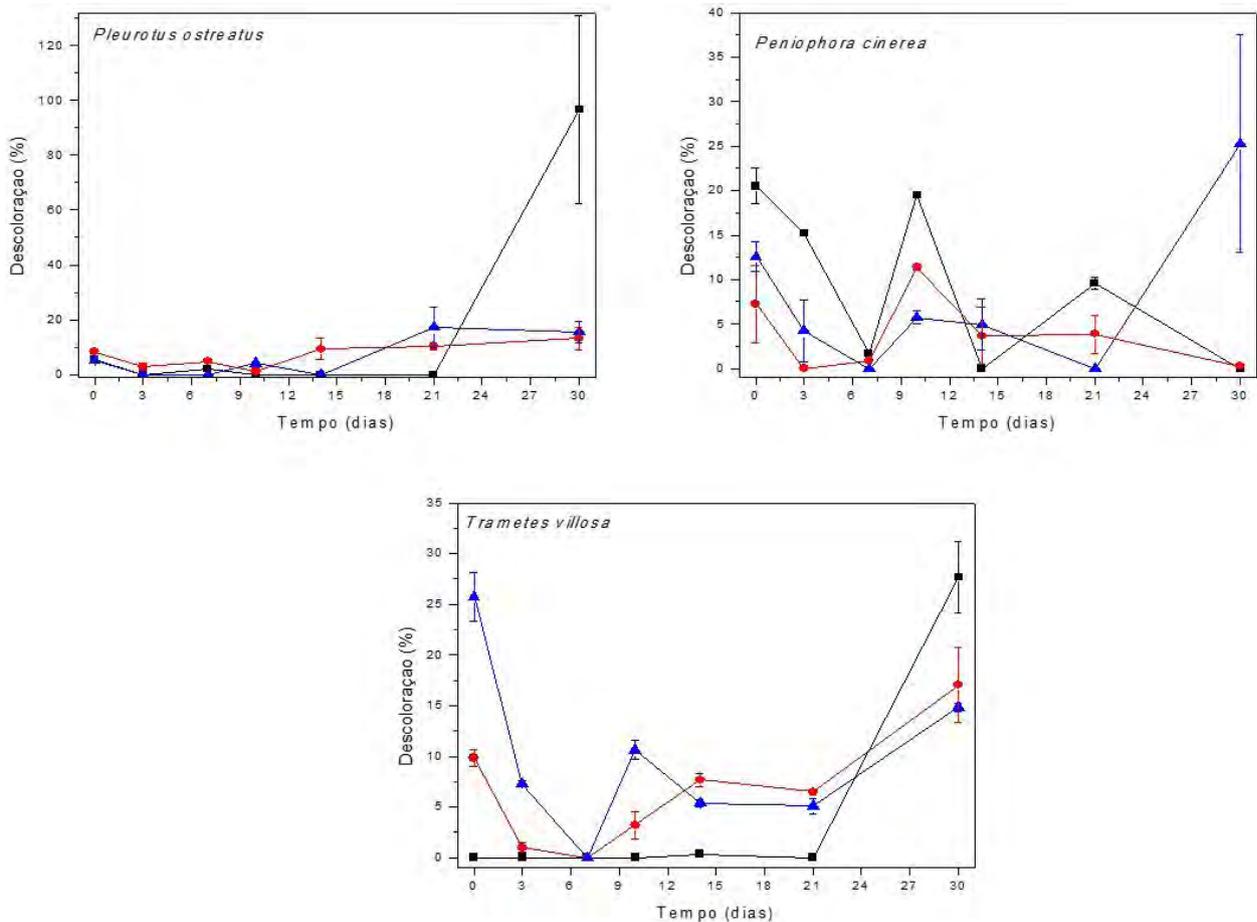


Figura 3. Descoloração do corante CI Reactive Blue 222 obtido a partir do cultivo de *P. ostreatus*, *P. cinerea* e *T. villosa* durante incubação de 0, 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias aplicados às concentrações iniciais de 0,03% (■), 0,0003% (●), 0,00003% (▲).

Tabela 1. Correlação entre atividade enzimática nos extratos brutos de Basidiomycetos e descoloração *in vitro*, por grama de biomassa seca.

Basidiomiceto	Coeficiente de Pearson (p)	Correlação	Probabilidade		Concentração do corante (%)
			(p)	(%)	
Peniophora cinerea	-0,400	negativa moderada	0,081	91,9	0,03
	-0,301	negativa fraca	0,196	80,4	0,0003
	0,005	positiva bem fraca	0,984	1,6	0,00003
Trametes villosa	0,200	positiva fraca	0,384	61,6	0,03
	-0,131	negativa bem fraca	0,572	42,8	0,0003
	-0,334	negativa fraca	0,139	86,1	0,00003
Pleurotus ostreatus	0,719	positiva forte	0,000	100	0,03
	0,314	positiva fraca	0,165	83,5	0,0003
	0,534	positiva moderada	0,013	98,7	0,00003

Essa pesquisa apresenta dados importantes sobre a descoloração *in vitro* do corante CI Reactive Blue 222, visto que o período de contato entre o extrato enzimático e o corante foi de apenas 2 horas. Em pesquisas semelhantes a essa, também foram obtidos altos valores de descoloração, no entanto em maior período de incubação. Na descoloração *in vitro* de 200 mg. L⁻¹ de CI Reactive Blue 19 por lacase de *Polyporus* sp. houve descoloração completa, nas condições ótimas, contudo somente após 72 horas de contato *in vitro*. Arshi *et al.* (2013) avaliando a descoloração de 3 diferentes corantes, por fungos isolados de solo, empregaram 0,01% de cada corante e observaram máximas descolorações a partir do 5^a dia de contato. Si *et al.* (2013) avaliando a descoloração de diferentes corantes em meio sólido por até 10 dias, empregaram 0,005% de corante e observaram maiores valores de descoloração após 3 dias de incubação. Nesse contexto, os extratos brutos, produzidos por *P. cinerea*, *T. villosa* e *P. ostreatus*, apresentam elevado potencial para aplicação na descoloração de corantes reativos, uma vez que estes fungos foram capazes de descolorir significativamente o corante mesmo em concentração elevada (0,03%).

A Figura 4 apresenta imagem da simulação de docking molecular entre o modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* e o corante CI Reactive Blue 222, em que o referido corante foi capaz de se atracar ao sítio ativo da enzima. Esse teste indicou a geração de complexos lacase - CI Reactive Blue 222 com energia de ligação negativa, na faixa de -592,85 KJ/Mol, evidenciando que a reação de degradação do corante CI Reative Blue 222 pela lacase é termodinamicamente viável.

Os resíduos do modelo teórico da lacase que interagiram com o corante e estabeleceram interações de hidrogênio e as interações interatômicas foram identificados e estão apresentados na Tabela 3. Verificou-se o estabelecimento de 5 interações de hidrogênio entre a molécula de corante e o modelo teórico da lacase nos resíduos de isoleucina (resíduo 25), glutamina (resíduo 71) serina (resíduo 163), aspartato (resíduo 172), alanina (resíduo 176). A análise dos resultados obtidos no servidor *Ghcom* permitiu identificar que os resíduos de aminoácidos que estabeleceram interações de hidrogênio com o corante compõem o provável sítio catalítico da lacase. Considerando que as interações de hidrogênio têm função importante na estabilização da reação entre a enzima e o ligante (Joy *et al* 2006), esses dados demonstram que a lacase é a responsável, não só pela descoloração, mas também pela degradação do CI Reactive Blue 222.

Estudos *in silico* para avaliar o potencial de lacases para descoloração/degradação de corantes tem associado energia de ligação negativa e ocorrência de interações de hidrogênio (Hsu *et al* 2012; Sridhar *et al* 2013; Srinivasan *et al* 2019). Testes empregando a estrutura tridimensional da lacase de *Rigidoporus* sp. apresentaram energia livre para a degradação de sete diferentes corantes associado ao estabelecimento de 1 a 3 interações de hidrogênio (Sridhar *et al* 2013).

Ainda, vale salientar que a ação de compostos de baixa massa molecular tem sido relatada como responsáveis pela descoloração de corantes (Moreira-Neto *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2014). No entanto, os resultados obtidos nesse estudo contribuem para o entendimento da interação entre a lacase de *P. ostreatus* e do corante CI Reactive Blue 222 e reforça a importância das lacases em tratamento ambiental, uma vez que demonstra a efetiva ação desta enzima no processo de descoloração/degradação.

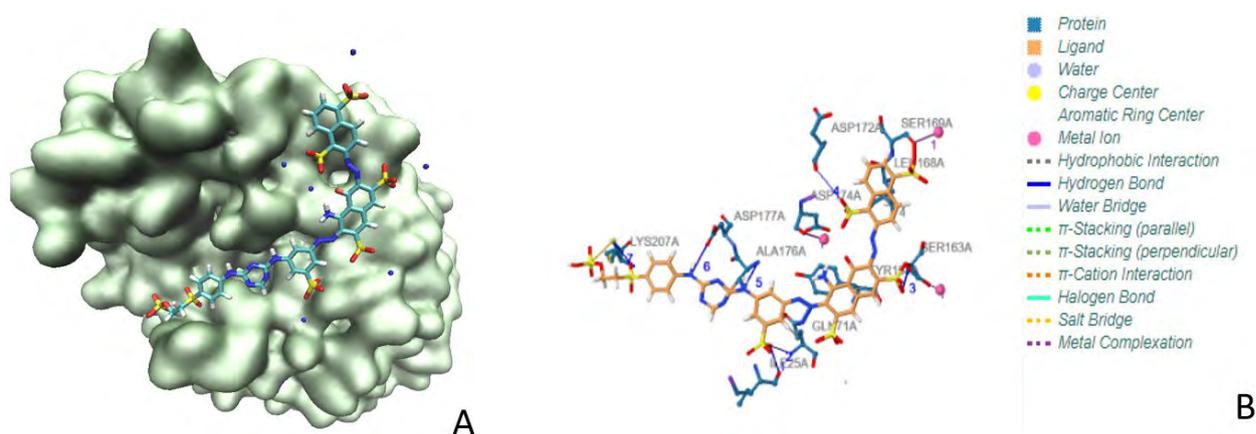


Figura 4. A) Lacase complexada ao ligante CI Reactive blue 222. B) Diagrama das interações interatômicas entre aminoácidos da Lacase e o corante Reactive Blue 222. Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3. Ligações de hidrogênio entre a lacase e o corante.

Resíduo (n°)	AA	Distância H-A	Distância D-A	Átomo doador	Átomo receptor
25	ILE	2.21	3.04	3838 [O]	4 [O]
71	GLN	3.62	4.08	326 [N]	3838 [O]
163	SER	2.29	3.01	3821 [O]	1051 [N]
172	ASP	3.40	3.72	3827 [O]	1125 [N]
176	ALA	2.24	3.08	3847 [N]	1154 [N]

Legenda: **AA**: aminoácido envolvido na ligação identificados pelo código de três letras, sendo ILE: isoleucina, GLN: glutamina, SER: serina, ASP: aspartato, ALA: alanina. **Distância H-A**: distância entre o átomo receptor e o átomo de hidrogênio; **Distância D-A**: distância entre o átomo doador e o átomo de hidrogênio. **Átomo doador e Átomo receptor**: número que o átomo ocupa na cadeia proteica seguido pela identificação do átomo. **N**: nitrogênio; **O**: oxigênio.

Esse estudo pode contribuir para o desenvolvimento de tecnologias de enzimas provenientes de fungos Basidiomicetos para biorremediação de efluentes. A relevância do desenvolvimento de tais tecnologias possibilita a aplicação de enzimas livre de células, evitando a introdução de organismos alóctones nas áreas a serem remediadas.

4. Conclusões

O uso de concentração elevada de CI Reactive Blue 222 não inibe a descoloração desse corante pelas lacases de *P. cinerea*, *P. ostreatus* e *T. villosa* avaliadas;

A lacase de *P. ostreatus* está diretamente relacionada à descoloração do corante CI Reactive Blue 222, sendo que os dados computacionais confirmam a relevância dessa enzima na degradação do corante devido ao estabelecimento de 5 interações de hidrogênio entre as referidas moléculas;

O melhor entendimento sobre comportamento da lacase em relação ao corante estudado CI Reactive Blue 222 possibilita o desenvolvimento de tecnologias enzimáticas, livre de células para aplicação em processos de tratamento de efluentes.

5. Referências

Aguiar A., Ferraz A. 2011 Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Química Nova*, 34(10):1729-1738.

- Aguiar A., Mendonça R., Rodriguez J., Ferraz A. 2010. Behavior of *Ceriporiopsis subvermispora* during *Pinus taeda* biotreatment in soybean-oil-amended cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(7):588-593.
- Alberts J.F., Gelderblom W.C.A., Botha A., Van Zyl W.H. 2009. Degradation of aflatoxin B (1) by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 135(1):47-52.
- Ali H. 2010. Biodegradation of Synthetic Dyes-A Review. *Water Air Soil Pollut*, 213(1-4):251-273.
- Arantes V., Milagres A.M.F. 2007. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(1):17-22.
- Arshi S., Jagvijay S., Sandeep B., Priyanku T., Vivek K. 2013. Biodegradation of Textile Dyes by Fungi Isolated from North Indian Field Soil. *Environment Asia*, 6(2):51-57.
- Ballaminut N., Machado K.M.G., Oliveira L.H.S., Matheus D.R. 2014 Physiological Characterization of Fungal Inoculum for Biotechnological Remediation of Soils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(4):561-570.
- Ballaminut N., Matheus D.R. 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2):248-252.
- Ballaminut N., Yamanaka R., Machado K.M.G. 2009. Interference of a Commercial Catalase preparation in Laccase and Peroxidase Activities. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5):1193-1198.
- Bergsten-Torrallba L.R., Nishikawa M.M., Baptista D.F., Magalhães D.P., Da Silva M. 2009. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:808-817.
- Bibi I., Bhatti H.N. 2012. Enhanced Biodecolorization of Reactive Dyes by Basidiomycetes Under Static Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8):2078-2090.
- Chequer F.M.D., Oliveira G.A.R.D., Ferraz E.R.A., Cardoso J.C., Zanoni M.V.B., Oliveira D.P.D. 2013. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact, in: Günay M. (Ed.) Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing. *In Tech*, pp. 268.
- Dos Santos A.B., Bisschops I.A.E., Cervantes F.J., Van Lier J.B. 2005. The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55 degrees C) and mesophilic (30 degrees C) anaerobic treatments. *Journal of Biotechnology*, 115(4):345-353.
- Faraco V., Pezzella C., Miele A., Giardina P., Sannia G. 2009. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation*, 20(2):209-220.
- Hammel K.E., Kapich A.N., Jensen Jr. K.A., Ryan Z.C. 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4):445-453.
- Haroun M., Idris A. 2009. Treatment of textile wastewater with an anaerobic fluidized bed reactor. *Desalination*, 237(1-3):357-366.
- Hsu, C. A. *et al.* Biological degradation of anthroquinone and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus* sp. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5109–5117 (2012).
- Işık M., Sponza D.T. 2007. Fate and toxicity of azo dye metabolites under batch long-term anaerobic incubations. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4):934-939.
- Joy, S., Nair, P. S., Hariharan, R., Pillai, M. R. 2006. Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and arguslab, a licensable freeware. *In Silico Biology*, 6(6): 601-605,
- Kalpana D., Velmurugan N., Shim J.H., Oh B.T., Senthil K., Lee Y.S. 2012. Biodecolorization and biodegradation of reactive Levafix Blue E-RA granulate dye by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Journal of Environmental Management*, 111:142-149.
- Kunz A., Peralta-Zamora P., De Moraes S.G., Durán N. 2002. Novas tendências no tratamento de A. efluentes têxteis. *Química Nova*, 25(1):78-82.
- Kyzas G.Z., Kostoglou M., Lazaridis N.K., Bikiaris D.N. 2013. Decolorization of Dyeing Wastewater Using Polymeric Absorbents - An Overview, in: Günay M. (Ed.) Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing. *In Tech*, pp. 268.

- Malachova K., Rybkova Z., Sezimova H., Cerven J., Novotny C. 2013. Biodegradation and detoxification potential of rotating biological contactor (RBC) with *Irpex lacteus* for remediation of dye-containing wastewater. *Water Research*, 47(19):7143-7148.
- Matheus D.R., Bononi V.L.R. 2002. Paper 2B-10, *in*: Gavaskar A.R., Chen A.S.C. (Eds.). Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds (Monterey, CA; May 2002). ISBN 1-57477-132-9, published by Battelle Press, Columbus, OH, www.battelle.org/bookstore.
- Moreira, S., Milagres, A.M.F.; Mussatto, S.I. 2014. Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system of salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*. *Sep. Purif. Technol.* 135, 183–189.
- Moreira-Neto S.L., Mussatto S.I., Machado K.M.G., Milagres A.M.F. 2013. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. *Letters in Applied Microbiology*, 56:283-290.
- Mukherjee S., Basak B., Bhunia B., Dey A., Mondal B. 2013. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(1):61-73.
- Neto S.L.M., Esteves P.J., Santos V.T.O., Paranhos A.P., Cescato F., Vitali V.M.V., Machado K.M.G. 2011. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27:2665-2673.
- Pakshirajan K., Kheria S. 2012. Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. *Journal of Environmental Management*, 101:118-123.
- Rodriguez E., Nuero O., Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase, *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6):909-916.
- Shankar S., Shikha S. 2012. Laccase Production and Enzymatic Modification of Lignin by a Novel *Peniophora* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(4):1082-1094.
- Si J., Cui B., Dai Y. 2013. Decolorization of chemically different dyes by white-rot fungi in submerged cultures. *Annals of Microbiology*, 63(3):1099-1108.
- Srebotnik E., Boisson J.-N. 2005. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5-6):785-789.
- Sridhar, S., Chinnathambi, V., Arumugam, P.; Suresh, P.K. 2013. In Silico and in Vitro Physicochemical Screening of *Rigidoporus* sp. Crude Laccase-assisted Decolorization of Synthetic Dyes-Approaches for a Cost-effective Enzyme-based Remediation Methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 911–922.
- Srinivasana, S., Sadasivam, S.K.; Gunalane, S.; Shanmugam, G.; Kothandan, G. 2019. Application of docking and active site analysis for enzyme linked biodegradation of textile dyes. *Environmental Pollution*, doi: 10.1016/j.envpol. 2019.02.080.
- Ten Have R., Teunissen P.J.M. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white rot fungi. *Chemical Reviews*, 101(11):3397-3413.
- Vieira, S.; Hoffmann, R. 1989. Estatística experimental. Editora Atlas, São Paulo, Brasil. 179pp.
- Wong D.W.S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2):174-209.
- Zaharia C., Suteu D. 2012. Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview, *in*: Puzyn T., Mostrag-Szlichtyng A. (Eds.) Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update. *In Tech*, pp. 55-87.

A mixobiota de manguezais e a ocupação de microhabitantes

CAVALCANTI, Laise de Holanda¹; AGRA, Leandro de A. Neves Nepomuceno²

¹ PG Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco

² Núcleo de Pesquisas, Diretoria Executiva de Tecnologia na Educação, Secretaria de Educação da Cidade do Recife

Emails: lhcantrade@gmail.com, nevesagra@gmail.com

Resumo

Mundialmente reconhecidos como suporte da biodiversidade da Natureza, os manguezais ocupam cerca de 150.000 km², distribuídos em 123 países, em zonas tropicais e subtropicais. Aproximadamente 7% da área ocupada encontram-se no Brasil, desde o Amapá até o Santa Catarina. Apesar do elevado nível de salinidade e das variações das marés, os mixomicetos compõem a microbiota dos manguezais, comportando-se como lignícolas, corticícolas e foliícolas. Estudos recentes em manguezais africanos demonstraram que podem atuar como biorremediadores, colaborando para a manutenção da qualidade do ambiente, além de terem potencial como bioindicadores. O primeiro registro, publicado em 1969, relata a presença de *Arcyria cinerea* em troncos mortos de *Rhizophora mangle* infestados por *Phellinus gilvus*, no Havaí. Até 1999, registros esporádicos informavam a ocorrência de 11 espécies, em manguezais norte-americanos e asiáticos. Atualmente, sabe-se que representantes de todas as subclasses e ordens de mixomicetos habitam manguezais na Ásia, África, América do Norte, Central e do Sul. Tem-se registro de 47 espécies, 22 gêneros e 10 famílias, destacando-se Stemonitaceae e Trichiaceae. Cerca de metade das espécies são raras, embora sejam frequentes em outros ecossistemas. Estudos desenvolvidos no Brasil avaliaram a associação dos mixomicetos com *Avicennia germinans*, *A. shaueriana*, *Conocarpus erectus*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle*. Espécies r-estrategistas, como *Echinostelium minutum*, habitam a casca das árvores vivas e o folheto aéreo, enquanto as K-estrategistas, menos frequentes, desenvolvem-se em troncos mortos, como *Lycogala epidendrum* e *Fuligo septica*. Análises moleculares poderão determinar a presença dos mixomicetos no solo e na vegetação periodicamente submersa, contribuindo para um melhor entendimento da sua diversidade em microhabitantes ainda inexplorados.

Palavras-chave: Myxomycetes, Microbiota de mangue, *Avicennia*, *Conocarpus*, *Laguncularia*, *Rhizophora*.

1. Introdução

Os mixomicetos constituem um grupo monofilético de Amebozoa inicialmente classificado na divisão Myxomycota do Reino Fungi (Ainsworth *et al.*, 1973; Stephenson e Rojas, 2017) devido às semelhanças morfológicas dos esporocarpos e ao fato de compartilharem muitos microhabitantes, como troncos mortos e folheto de solo.

As pesquisas sobre a ecologia dos mixomicetos tiveram início nos anos 1980, a maioria desenvolvida em regiões temperadas da Europa e América do Norte (Rojas *et al.*, 2014) mas ainda existem muitos tipos de ambientes e microhabitantes tropicais onde a mixobiota foi pouco pesquisada, como por exemplo o ecossistema de manguezal.

Mundialmente reconhecidos como suporte da biodiversidade da Natureza, os manguezais são característicos de regiões tropicais e subtropicais, constituindo uma zona de transição entre o ambiente terrestre e o marinho, totalizando uma área aproximada de 150.000 km² (Ministério do Meio Ambiente, 2018). O Brasil destaca-se como o terceiro país com a maior área de manguezal do mundo, distribuída desde a Região Norte, que abriga 80% dos manguezais, até a Região Sul (Agra *et al.*, 2015; Ferreira e Lacerda, 2016).

Esses ambientes apresentam níveis de temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento dos mixomicetos e microhabitantes comumente encontrados em florestas tropicais. Todavia, a salinidade elevada e a instabilidade decorrente da variação das marés restringem a ocupação de vários deles, como os troncos mortos caídos, e torna quase inviável a ocupação de outros, como o folheto de solo.

A degradação do ecossistema provocada pelo desenvolvimento urbano, fazendas de cultivo de camarão e atividades portuárias tem estreita ligação com a pobreza das comunidades que habitam as zonas costeiras, sendo necessárias medidas que visem à restauração e manutenção da biodiversidade dos manguezais (Ministério do

Meio Ambiente, 2018). Estudos recentes em manguezais africanos demonstraram que os mixomicetos podem atuar como bioindicadores e como biorremediadores, colaborando para a manutenção da qualidade do ambiente (Kryvomaz e Andrusishina, 2017). Pesquisas desenvolvidas no Brasil registraram a presença desses organismos em microhabitats oferecidos por árvores características dos manguezais, pertencentes aos gêneros *Rhizophora* L., *Avicennia* L., *Laguncularia* Gaertn. f. e *Conocarpus* L., revelando uma insuspeitada diversidade de espécies (Damasceno *et al.*, 2009, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2014, 2016; Agra *et al.*, 2010, 2015).

Apresenta-se neste capítulo uma síntese do conhecimento existente sobre a mixobiota de manguezais, com especial atenção para os microhabitats ocupados, baseada em revisão da literatura mundial e na experiência dos autores, decorrente de pesquisas realizadas nas duas últimas décadas em manguezais brasileiros.

2. Microhabitats ocupados pelos mixomicetos

No estágio trófico do ciclo de vida, os mixomicetos se apresentam como mixamebas ou mixoflagelados uninucleados, haploides, que se multiplicam por divisões binárias no substrato onde ocorreu a germinação do esporo. No estágio trófico seguinte, que se inicia pelo zigoto originado da fusão de isogametas (raramente por apomixia), o mixomiceto se apresenta como uma massa protoplasmática sem forma definida, multinucleada, móvel, de vida livre, de dimensões microscópicas (protoplasmódio) ou visível à vista desarmada (afanoplasmódio e faneroplasmódio). A duração de cada estágio trófico depende tanto da espécie quanto das condições do microhabitat ocupado. Em ambas as fases, os mixomicetos são fagotróficos, predominantemente bacterívoros, muito sensíveis às variações de luminosidade, níveis de acidez e umidade do ar e do substrato. A capacidade de formar microcistos na fase amebóflagelada e esclerócios na fase plasmodial permite aos mixomicetos sobreviverem a condições adversas e ocuparem microhabitats com características ecológicas instáveis.

A fase esporulante, quando os mixomicetos são fixos e apresentam forma definida, se inicia pela maturação do plasmódio ou é induzida por alterações nas condições ambientais, principalmente tipo de luz e disponibilidade de alimento. Os esporângios, etálios, pseudoetálios e plasmodiocarpus, com dimensões e morfologia características para cada espécie, podem ser diminutos (≤ 1 mm), como em *Echinostelium* de Bary (Echinosteliales) e *Licea* Schrad. (Liceales), ou atingir 0,5 m, como os etálios de algumas espécies de *Amaurochaete* Rostaf. (Stemonitales) e *Fuligo* Haller (Physarales).

Os esporos variam em quantidade por esporocarpo (8 a ≥ 1000) e diâmetro (4-20 μ m), e podem permanecer viáveis por longos períodos, conforme a espécie e as condições do ambiente onde ocorreu a esporulação. Esporos e microcistos são dispersos por correntes de ar, água da chuva e animais invertebrados ou vertebrados, atingindo longas distâncias e permitindo que os mixomicetos se distribuam em diversos tipos de ecossistemas, alguns bem restritivos, como desertos e manguezais.

Nos diferentes ecossistemas que habitam, os mixomicetos interagem com as plantas, vivas ou mortas, que lhes servem de substrato e com as variáveis abióticas do ambiente, utilizando diferentes estratégias para ocupar os microhabitats neles disponíveis. Considerando os esquemas de seleção propostos por MacArthur (1962), as espécies que se enquadram no sistema K ocupam microhabitats que não sofrem grandes variações e estão inseridos em ambientes com maior umidade e com boa disponibilidade hídrica por períodos prolongados, tais como troncos mortos e folheto do solo. As espécies K-estrategistas apresentam longo período na fase plasmodial, possibilitando desenvolver esporocarpos de maiores dimensões, como etálios de *Fuligo septica* (L.) F.H. Wigg. e *Lycogala epidendrum* (L.) Fr. O sistema r compreende microhabitats menos estáveis, relativamente efêmeros ou que oscilam rapidamente entre condições favoráveis e desfavoráveis, tais como fezes de herbívoros e a casca de árvores vivas, sujeitas, dentre outros fatores, à interferência dos ventos e alta luminosidade, que influenciam na perda mais rápida de umidade do substrato.

As espécies de mixomicetos que ocupam esses ambientes, como as corticícolas e as presentes no folheto aéreo, apresentam curto ciclo de vida (1-3 semanas), número reduzido de pequenos esporocarpos (≤ 2 mm), formados por protoplasmódios ou, mais raramente, por pequenos afanoplasmódios e faneroplasmódios (≤ 2 mm) e são capazes de responder rapidamente às variações nas condições do ambiente, formando microcistos ou esporulando (Everhart e Keller, 2008).

As diferentes estratégias de vida e a longa viabilidade dos esporos permitem às cerca de 1000 espécies conhecidas (Lado, 2005-2019) ocuparem diferentes ecossistemas em diversos microhabitats, com significativas variações de pH, umidade, luminosidade e temperatura, sendo classificadas como lignícolas, corticícolas, foliícolas, florícolas, fomicolas, suculentícolas, micetícolas, muscícolas, liquenícolas e nivícolas (Rojas *et al.*, 2014). As espécies mais conhecidas, com ampla distribuição mundial, são comumente lignícolas (troncos de árvores mortos) e formam esporocarpos de fácil observação no campo, como *Arcyria denudata* (L.) Wettst., *Hemitrichia calyculata* (Speg.) M.L. Farr, *H. serpula* (Scop.) Rostaf. ex Lister (Trichiales), *Fuligo septica* (Physarales), *Lycogala epidendrum* (Liceales) e *Stemonitis splendens* Rostaf. (Stemonitales). O ciclo de vida dessas espécies é relativamente longo e permanecem por meses na fase de faneroplasmódio ou afanoplasmódio, na superfície ou no interior de troncos e galhos mortos, caídos ou presos na planta-mãe, comportando-se como K-estrategistas (Agra *et al.*, 2015). O ciclo de vida das espécies que apresentam protoplasmódio, ou pequenos faneroplasmódios e afanoplasmódios é geralmente curto, completando-se em poucas semanas. Tais características, as enquadram entre as r-estrategistas, como as dos gêneros *Echinostelium*, *Clastoderma* A. Blytt, *Cribraria* Pers., *Licea* e *Macbrideola* H.C. Gilbert.

3. Mixobiota de manguezal

3.1. Histórico dos estudos sobre a mixobiota de manguezais

Devido ao fato de ocuparem os mesmos ambientes e substratos dos macrofungos, a presença de mixomicetos em manguezais começou a ser documentada no final dos anos 1960, em pesquisas micológicas no Havaí, quando esporângios de *Arcyria cinerea* (Bull.) Pers. foram coletados sobre ramos e caules mortos de *Rhizophora mangle* L., caídos no solo, infestados por *Phellinus gilvus* (Schw.) Pat. (Kohlmeyer, 1969). Na lista de espécies coletadas no atol Aldabra, Oceano Índico, Ing e Hnatiuk (1981) citam espécimes de *Physarum stellatum* (Masse) G. Martin e *P. globuliferum* (Bull.) Pers. coletados em casca de "mangrove poles", sem indicar a qual das espécies de mangue que ocorrem na ilha Picard pertenciam as amostras. Todavia, na revisão sobre a fitossociologia dos mixomicetos, ao tratar das espécies que habitam manguezais, Ing (1994) comenta que apenas se dispunha do registro de *Arcyria denudata* (L.) Wettst., embora tenha se baseado no artigo de Kohlmeyer (1969).

Até 1998 as informações restringiam-se a manguezais norte-americanos (Havaí) e asiáticos (China), baseadas em coletas acidentais de espécimes esporulados sobre troncos mortos, pertencentes aos gêneros *Arcyria* F.H. Wigg. (Trichiaceae), *Ceratiomyxa* J. Schröt. (Ceratiomyxaceae), *Licea* Schrad. (Liceaceae) e *Physarum* Pers. (Physaraceae), totalizam 11 espécies (Kohlmeyer, 1969; Lee e Baker, 1973; Chung *et al.*, 1998).

Os registros seguintes tratam da ocorrência de mixomicetos em manguezais brasileiros, iniciados em 1999 na Reserva Biológica de Pacatuba, em Sergipe, com o relato de seis espécies presentes no córtex de *R. mangle* e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn., representando as Echinosteliaceae, Liceaceae, Physaraceae, Stemonitaceae e Trichiaceae (Bezerra *et al.*, 1999). A primeira revisão sobre mixomicetos associados a manguezais, a nível mundial, realizada com base na literatura e em material coletado no Brasil, listou seis famílias, dez gêneros e 15 espécies, sendo cinco associadas a *R. mangle*, uma ao basidiomiceto *Stereum hirsutum* (Willd.:Fr.) S. Gray e 11 a *L. racemosa*, nos estados do Amapá, Pará, Pernambuco e Sergipe (Cavalcanti *et al.*, 2000). Os registros para manguezais de Porto Rico efetuados por Novozhilov *et al.* (2001), Nieves-Rivera e Stephenson (2004) e Nieves-Rivera (2005), obtidos em estudos que também abrangiam outros ecossistemas, ampliaram o número de gêneros [*Didymia* Pers., *Stemonitopsis* (Nann. -Bremek.) Nann. -Bremek., *Stemonitis* Roth] e acrescentaram espécies de Didymiaceae (1), Echinosteliaceae (1), Physaraceae (2), Stemonitaceae (2) e Trichiaceae (2) à lista elaborada por Cavalcanti *et al.* (2000).

Em pesquisa sobre macrofungos desenvolvida em manguezal da ilha de Santa Catarina, Região Sul do Brasil, Trierveiler-Pereira *et al.* (2008) coletaram espécimes de mixomicetos sobre a casca do tronco de *Avicennia schaueriana* Stapf. & Leechm ex Moldenke, identificados como *Stemonitis fusca* Roth, *S. splendens* Rostaf. e *Physarum pezizoideum* (Jungh) Pav. & Lag.

Uma série de estudos foi iniciada nos estados de Pernambuco e Maranhão, exclusivamente direcionados à mixobiota de manguezais, resultando no acréscimo de seis gêneros e 21 espécies, esporuladas sobre *R. mangle*, *L. racemosa*, *Avicennia germinans* (L.) L. e *Conocarpus erectus* L., ampliando o conhecimento sobre a ocupação de microhabitats (Damasceno *et al.*, 2009,2011; Cavalcanti *et al.*, 2014, 2016; Agra *et al.*, 2015; Barbosa e Cavalcanti, 2019).

O registro de *Lycogala epidendrum* efetuado por Savillo (2015) constitui a primeira referência de mixomicetos em manguezais nas Filipinas e *L. conicum* Pers. foi assinalada pela primeira vez para a mixobiota do ecossistema. Recentemente, a ocorrência de *Hemitrichia serpula* na ilha Praslin, arquipélago das Seychelles foi relatada por Kryvomaz e Andrusishina (2017), constituindo o primeiro registro publicado para a África.

3.2. Espécies ocorrentes em manguezais

As informações sobre a mixobiota de manguezais aumentaram significativa desde o primeiro registro em troncos mortos efetuados no Havai. Atualmente, sabe-se que representantes de todas as subclasses e ordens habitam manguezais na Ásia, África, América do Norte, Central e do Sul, destacando-se as Stemonitales, Trichiales e Physarales. A análise das publicações disponíveis indica que 47 espécies, distribuídas em 22 gêneros e 10 famílias tem registros em escala global, a maioria obtidos no Brasil, nos estados do Amapá, Maranhão, Pará, Pernambuco, Santa Catarina e Sergipe. A Tabela 1 reúne as espécies assinaladas até o momento, indicando os países para os quais foram referidas e fontes da literatura; a nomenclatura adotada segue Lado (2005-2019) e as famílias estão listadas em ordem alfabética, assim como os respectivos gêneros e espécies.

A ordem Ceratiomyxales, que abrange quatro espécies (Lado, 2005-2019), foi assinalada apenas uma vez, em estudo sobre fungos de manguezais no Havai realizado por Lee e Baker (1973). O espécime obtido foi identificado apenas a nível de gênero, mas, provavelmente, pertence a *C. fruticulosa*, espécie cosmopolita e de ampla distribuição em regiões tropicais.

As duas famílias que compõem a ordem Echinosteliales tem representantes no ambiente de manguezal, onde ocorrem *Echinostelium* aff. *colliculosum* (O.F. Müll.) T. Macbr., *E. minutum* de Bary (Echinosteliaceae) e *Clastoderma debaryanum* A. Blytt (Clastodermataceae), citadas por Nieves-Rivera (2005) para a Ilha Magueyes, em Porto Rico, Cavalcanti *et al.* (2014) para o manguezal de Rio Formoso, em Pernambuco, e Agra *et al.* (2015) para a ilha de São Luís, no Maranhão.

Liceales compreendem as famílias Liceaceae, com um gênero e 76 espécies, Cribrariaceae, com dois gêneros e 47 espécies, e Reticulariaceae, com cinco gêneros e 36 espécies (Lado, 2005-2019). As três famílias estão representadas em manguezais da China (*Licea*), Filipinas (*Lycogala* Adans.) e Brasil (*Cribraria*, *Licea*, *Lycogala*), porém com raros registros (Chung *et al.*, 1998; Bezerra *et al.*, 1999; Cavalcanti *et al.*, 2000, 2014, 2016; Agra *et al.*, 2010, 2015; Savillo, 2015; Barbosa e Cavalcanti, 2019). Na lista de Cavalcanti *et al.* (2000) para manguezais de Pernambuco *Licea kleistobolus* G. W. Martin. constituiu novo registros para o Brasil, esporulada sobre tronco vivo de *L. racemosa*, em Ipojuca, litoral sul de Pernambuco.

A ordem Physarales, a mais numerosas em gêneros (16) e espécies (394), tem sido assinalada em manguezais desde a década de 1970, com registro de uma espécie não identificada de *Physarum* (Physaraceae) no Havai (Lee e Baker, 1973). As duas das três famílias da ordem estão representadas em Porto Rico por dois gêneros e três espécies, citadas por Nieves-Rivera (2005), com base em espécime de *Diderma effusum* (Schwein.) Morgan (Didymiaceae) coletados na Ilha Magueyes, mar do Caribe, e de *Physarum album* (Bull.) Chevall. e *P. polycephalum* Schwein., obtidos por Novozhilov *et al.* (2001) no manguezal da Playa San Agustín. No Brasil, tem-se registro de dois gêneros e duas espécies de Didymiaceae e quatro gêneros e cinco espécies de Physaraceae, ocorrentes em manguezais do Sudeste, na Ilha de Santa Catarina, e Nordeste, no estuário do rio Formoso e rio dos Passos litoral sul de Pernambuco, na REBIO de Santa Isabel, em Pacatuba, Sergipe, e litoral de Alcantara, no Maranhão (Bezerra *et al.*, 1999; Cavalcanti *et al.*, 2005, 2014, 2016; Trierveiler-Pereira *et al.*, 2008; Agra *et al.*, 2015). *Physarum pezizoideum* (Jungh.) Pavill. & Lagarde é o único representante das Physaraceae citado por Trierveiler-Pereira *et al.* (2008), porém, no herbário FLOR, onde os autores depositaram os espécimes, não foi localizada exsicata dessa espécie. No acervo, constam duas exsicatas de *P. compressum* Alb. & Schwein. (FLOR 31882, Trierveiler-Pereira, L.; Maccarini, T.B. 161; FLOR 31883, Trierveiler-Pereira, L.; Baltazar, J.M. 191), coletadas no mangue do Itacorubi, Ilha de Santa Catarina, em janeiro e fevereiro de 2006, que provavelmente correspondem ao registro publicado em 2008.

O primeiro registro da ocorrência de espécies de Stemonitales em manguezais foi efetuado por Lee e Baker (1973), que relatam a ocorrência de uma espécie não identificada de *Stemonitis*, coletada sobre tronco morto, no Havai. Nieves-Rivera e Stephenson (2004) referem à ocorrência de *Stemonitis splendens* em *R. mangle* para Porto

Tabela 1. Mixomicetos com registro de ocorrência em manguezais no Brasil e no mundo.

Família	Espécie	País/fonte*
Ceratiomyxaceae	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> (O.F. Müll.) T. Macbr.	Havaí ²
Clastodermataceae	<i>Clastoderma debaryanum</i> A. Blytt	Brasil (PE) ^{13,14}
Cribrariaceae	<i>Cribraria confusa</i> Nann. -Bremek. & Y. Yamam.	Brasil (MA, PE) ^{13,14}
	<i>Cribraria violacea</i> Rex	Brasil (MA) ¹⁴
Didymiaceae	<i>Diachea leucopodia</i> (Bull.) Rostaf.	Brasil (PE) ^{5,13}
	<i>Didymium clavus</i> (Alb. & Schwein.) Rabenh.	Brasil (PE) ⁵
	<i>Diderma effusum</i> (Schwein.) Morgan	Porto Rico ⁸
Echinosteliaceae	<i>Echinostelium aff colliculosum</i> K.D. Whitney & H.W. Keller	Brasil (PE) ⁵
	<i>Echinostelium minutum</i> de Bary	Brasil (MA) ¹⁴ Porto Rico ⁸
	<i>Licea kleistobolus</i> G.W. Martin	Brasil (PE) ⁵
Liceaceae	<i>Licea scyphoides</i> T.E. Brooks & H.W. Keller	China ³
	<i>Licea testudinacea</i> Nann. - Bremek.	Brasil (PE) ¹⁸
Physaraceae	<i>Badhamia</i> sp.	Brasil (SE) ⁴
	<i>Fuligo septica</i> (L.) F.H. Wigg.	Brasil (MA) ¹⁴
	<i>Physarella oblonga</i> (Berk. & M.A. Curtis) Morgan	Brasil (PE) ¹⁹
	<i>Physarum auriscalpium</i> Cooke	Brasil (PE) ^{13,16}
	<i>Physarum echinosporum</i> Lister	Brasil (PE) ¹³
	<i>Physarum album</i> (Bull.) Chevall.	Porto Rico ⁶
	<i>Physarum pezizoideum</i> (Jungh.) Pavill. & Lagarde	Brasil (SC) ⁹
	<i>Physarum polycephalum</i> Schwein.	Porto Rico ⁶
	<i>Physarum tenerum</i> Rex	Brasil (PE) ¹⁶
	<i>Physarum roseum</i> Berk. & Broome	Brasil (MA, PE) ^{13,14}
Reticulariaceae	<i>Lycogala conicum</i> Pers.	Flórida ¹⁵
	<i>Lycogala epidendrum</i> (L.) Fr.	Brasil (MA) ^{11,14}
Stemonitaceae	<i>Colaria arcyrionema</i> (Rostaf.) Nann. -Bremek. ex Lado	Brasil (MA, PE) ^{5,13,14}
	<i>Comatricha pulchella</i> (C. Bab.) Rostaf.	Brasil (PE) ^{12,13}
	<i>Comatricha tenerrima</i> (M.A. Curtis) G. Lister	Brasil (MA) ¹⁴
	<i>Macbrideola scintillans</i> H.C. Gilbert	Brasil (PE) ¹³
	<i>Stemonaria fuscooides</i> Nann. -Bremek. & Y. Yamam.	Brasil (PE) ^{10,12,13}
	<i>Stemonaria irregularis</i> (Rex) Nann.- Bremek., R. Sharma & Y. Yamam.	Brasil (PE) ^{12,13,16}
	<i>Stemonitopsis reticulata</i> (H.C. Gilbert) Nann. -Bremek.& Y. Yamam.	Brasil (PE) ¹²
	<i>Stemonitopsis typhina</i> (F.H. Wigg.) Nann.-Bremek.	Porto Rico ⁶
	<i>Stemonitis flavogenita</i> E. Jahn	Brasil (PE) ¹³
	<i>Stemonitis fusca</i> Roth	Brasil (PE, SC) ^{9,12,13,16}
Trichiaceae	<i>Stemonitis herbatica</i> Peck	Brasil (PE) ^{13,16}
	<i>Stemonitis splendens</i> Rostaf.	Brasil (PE, SC) ^{9,13} Porto Rico ^{7,8}
	<i>Stemonitis virginiana</i> Rex	Brasil (PE) ^{12,16}
	<i>Arcyria cinerea</i> (Bull.) Pers.	Havaí ¹ China ³ Brasil (PE) ^{13,1} Porto Rico ^{6,8}
	<i>A. denudata</i> (L.) Wettst.	China ³ Brasil (AP, PE) ^{5,13}
	<i>A. incarnata</i> (Pers. ex J.F. Gmel.) Pers.	Porto Rico ⁶
	<i>A. pomiformis</i> (Leers) Rostaf.	Brasil (PE) ⁵
	<i>A. virescens</i> G. Lister	Havaí ²
Trichiaceae	<i>Hemitrichia calyculata</i> (Speg.) Farr	Brasil (PE) ¹³
	<i>Hemitrichia serpula</i> (Scop.) Rostaf.	Brasil (PA) ⁵ Seychelles ¹⁷
	<i>Oligonema flavidum</i> (Peck) Peck	Brasil (MA) ¹⁴
	<i>Perichaena chrysoesperma</i> (Curt.) Lister	Porto Rico ⁸
	<i>Perichaena depressa</i> Lib.	Brasil (PE, SE) ^{4,5,13} Porto Rico ⁸

*Fontes: 1. Kohlmeyer, 1969; 2. Lee e Baker, 1973; 3. Chung *et al.*, 1998; 4. Bezerra *et al.*, 1999; 5. Cavalcanti *et al.*, 2000; 6. Novozhilov *et al.*, 2001; 7. Nieves-Rivera e Stephenson, 2004; 8. Nieves-Rivera, 2005; 9. Trierveiler-Pereira *et al.*, 2008; 10. Damasceno *et al.*, 2009; 11. Agra *et al.*, 2010; 12. Damasceno *et al.*, 2011; 13. Cavalcanti *et al.*, 2014; 14. Agra *et al.*, 2015; 15. Savillo, 2015; 16. Cavalcanti *et al.*, 2016; 17. Kryvomaz e Andrusishina, 2017. 18. Barbosa e Cavalcanti, 2019. 19. Este trabalho.

Rico e os primeiros trabalhos desenvolvidos no Brasil informam a presença de uma espécie não identificada de *Comatricha* Preuss. coletada sobre tronco morto de *R. mangle* e *Collaria arcyronema* (Rostaf.) Nann. - Bremek. ex Lado, esporulada sobre *L. racemosa* (Bezerra *et al.*, 1999; Cavalcanti *et al.*, 2000). Duas das três espécies assinaladas por Trierveiler-Pereira *et al.* (2008) no manguezal da ilha de Santa Catarina, no sul do Brasil, *Stemonitis fusca* e *S. splendens*, pertencem às Stemonitales. Nos estudos desenvolvidos em manguezais do litoral sul de Pernambuco, predominam as espécies de Stemonitales, algumas referidas pela primeira vez para a América do Sul, como *Stemonaria fuscooides* Nann. - Bremek. & Y. Yamam. (Damasceno *et al.*, 2009, 2011).

As Trichiales compreendem 14 gêneros e cerca de 174 espécies, e destacam-se entre os Myxomycetes por possuírem esporocarpos mais conspícuos, de coloração geralmente vistosa e de tamanho fácil de serem observados a olho desarmado. Pertence às Trichiales o primeiro registro de mixomiceto em manguezal, *Arcyria cinerea* (Bull.) Pers. no Haváí (Kohlmeyer, 1969), espécie tipicamente encontrada em diversos microhabitats florestais tropicais, de hábitos generalistas e com maior número de registros em manguezal (Tab.1). Outras espécies do gênero *Arcyria* compõem ainda mais da metade dos registros de espécies desta ordem nesse ecossistema, merecendo destaque *A. virescens* G. Lister (Lee e Baker, 1973), só registrada no Haváí, *A. Incarnata* (Pers. ex J.F. Gmel.) Pers., apenas registrada em Porto Rico (Novozhilov *et al.*, 2001) e *A. pomiformis* (Leers) Rostaf., apenas registrada no Brasil (Cavalcanti *et al.*, 2000). Entre outros destaques da ordem neste ecossistema estão *Hemitrichia calyculata* (Speg.) Farr, coletada em Pernambuco (Brasil), cujos esporocarpos foram coletados em associação com besouros do gênero *Baeocera*, o que anteriormente foi registrado apenas por Lemos *et al.* (2010) em fragmento de Floresta Atlântica. O primeiro registro de *Oligonema flavidum* (Peck) Peck neste ecossistema a nível mundial foi obtido no manguezal de Alcântara, no Maranhão, sendo a primeira referência da espécie para o Brasil (Agra *et al.*, 2015).

3.3. Microhabitats ocupados

Rhizophora mangle (Rhizophoraceae), conhecida como mangue vermelho, é uma das espécies mais comuns de manguezal, encontrada em áreas de salinidade média; pode atingir até 19 m de altura e apresenta tronco com diâmetro médio de 30 cm, sustentado por típicas raízes escoras (Maia *et al.*, 2005). *Avicennia schaueriana* e *A. germinans*, conhecidas como mangue-preto, siriúba ou mangue-canoé, apresentam alta tolerância ao sal, podem atingir até 11 m de altura e apresentar troncos com cerca de 20 cm de diâmetro. *Conocarpus erectus*, o mangue de botão, pode chegar a 10 m de altura, com tronco de 30 cm de diâmetro e são geralmente encontrados na borda do manguezal onde a influência salina é mais baixa ou intermediária (Damasceno *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2016). Os indivíduos de *Laguncularia racemosa*, conhecida como mangue-branco, mangue-manso ou tinteiro, atingem até 12 m de altura com tronco de até 30 cm de diâmetro, e habitam áreas entre a borda e o interior do manguezal, com tolerância intermediária à salinidade (Cavalcanti *et al.*, 2016). A distribuição em diferentes faixas de salinidade das espécies de manguezal com mais registros de ocorrência de mixomicetos em diferentes países, *R. mangle*, *C. erectus* e *L. racemosa*, pode influenciar a presença e diversidade de espécies nos microhabitats que oferecem. Apenas uma espécie de mixomiceto foi registrada por Cavalcanti *et al.* (2016) no folheto aéreo em indivíduos de *A. germinans* no manguezal do Rio Formoso, em Pernambuco; no mesmo local e período de estudo, três gêneros e três espécies foram observados nos raminhos do folheto aéreo e na casca do tronco vivo em indivíduos de *L. racemosa* e maior número de gêneros (5) e espécies (7) foi encontrado em todos os microhabitats analisados nos indivíduos de *R. mangle*, presentes nas zonas de salinidade baixa ou intermediária.

Os primeiros relatos da presença de mixomicetos em manguezais basearam-se em espécimes coletados sobre troncos e ramos mortos (Kohlmeyer, 1969; Lee e Baker, 1973; Chung *et al.*, 1998; Novozlov *et al.*, 2001), porém os estudos direcionados para investigar a mixobiota de manguezais no Brasil mostram que o folheto aéreo e a casca do tronco de árvores vivas constituem os microhabitats preferenciais para a maioria das espécies (Damasceno *et al.*, 2009,2011; Cavalcanti *et al.*, 2014, 2016; Agra *et al.*, 2015). Apenas 22% das espécies representantes das ordens Liceales, Stemonitales e Trichiales, ocupam o microhabitat oferecido por galhos e troncos mortos, caídos ao solo ou ainda presos na planta-mãe, acima da linha da maré e 16% foram registradas no componente lenhoso do folheto aéreo (Tab. 2-5). A maioria dessas espécies é cosmopolita e predominantemente lignícola em outros ecossistemas, como *Arcyria cinerea* e *Hemitrichia serpula* (Trichiaceae), *Fuligo septica*, *Physarum album* e *P. polycephalum* (Physaraceae), *Lycogala epidendrum* (Reticulariaceae), *Stemonitis fusca* e *S. splendens* (Stemonitaceae).

Rojas *et al.* (2014) comentam que apesar do folheto de solo e o folheto aéreo serem constituídos basicamente pelo mesmo tipo de substrato – folhas e raminhos mortos, restos de flores e frutos – as mixobiotas a eles associadas são distintas. Na mixobiota de manguezal conhecida até o momento, entre as três espécies que ocupam o folheto de solo, *Stemonitis fusca*, *Stemonaria fuscoidea* (Tab. 2) e *Physarum echinosporum* (Tab. 3), apenas a primeira foi também assinalada em folheto aéreo.

As pesquisas realizadas em manguezais brasileiros evidenciam que, embora façam parte da microbiota, cerca de metade das espécies são de rara ocorrência ou pouco frequentes (Damasceno *et al.*, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2014, 2016; Agra *et al.*, 2015). A diversidade taxonômica é baixa, seja a relacionada com a espécie de forófito analisada, seja com o tipo de microhabitat ocupado (Cavalcanti *et al.*, 2016).

Tabela 2. Plantas de manguezal utilizadas como substrato para desenvolvimento de mixomicetos da ordem Stemonitales.

Planta	Espécie/substrato*	Fonte**
<i>Avicennia germinans</i>	<i>Stemonaria irregularis</i> ³	10
<i>Avicennia schaueriana</i>	<i>Stemonitis fusca</i> ¹ ; <i>Stemonitis splendens</i> ¹	5
<i>Conocarpus erectus</i>	<i>Collaria arcyriomena</i> ¹ ; <i>Comatricha pulchella</i> ^{1,2} ; <i>Macbrideola scintillans</i> ¹ ; <i>Stemonaria fuscoidea</i> ⁴ ; <i>Stemonaria irregularis</i> ^{1,6} ; <i>Stemonitis flavogenita</i> ³ ; <i>Stemonitis fusca</i> ^{1,3,4,6,7} ; <i>Stemonitis herbática</i> ³ ; <i>Stemonitis splendens</i> ^{1,3} ; <i>Stemonitopsis reticulata</i> ⁶	7-8
<i>Laguncularia racemosa</i>	<i>Collaria arcyriomena</i> ¹ ; <i>Stemonitis fusca</i> ⁶	1-10
<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Collaria arcyriomena</i> ¹ ; <i>Comatricha tenerima</i> ¹ ; <i>Stemonaria fuscoidea</i> ¹ ; <i>Stemonitis herbática</i> ³ ; <i>Stemonitis splendens</i> ⁷ ; <i>Stemonitis virginiana</i> ⁶ ; <i>Stemonitis sp.</i> ⁷	3-4 6-7 9-10
Não indicada	<i>Stemonitopsis typhina</i> ⁵	2

*Substratos: 1= casca do tronco vivo. 2= folheto aéreo. 3=folha do folheto aéreo. 4 = folheto de solo. 5=não informado. 6= raminhos do folheto aéreo. 7= tronco morto.

**Fontes: 1. Cavalcanti *et al.*, 2000; 2. Novozhilov *et al.*, 2001; 3. Nieves-Rivera e Stephenson, 2004; 4. Nieves –Rivera, 2005; 5. Trierveiler-Pereira *et al.*, 2008; 6. Damasceno *et al.*, 2009; 7. Damasceno *et al.*, 2011; 8. Cavalcanti *et al.*, 2014; 9. Agra *et al.*, 2015; 10. Cavalcanti *et al.*, 2016.

Tabela 3. Plantas de manguezal utilizadas como substrato para desenvolvimento de mixomicetos da ordem Physarales.

Planta	Espécie/substrato*	Fonte**
<i>Avicennia germinans</i>	<i>Diderma effusum</i> ⁴ ; <i>Physarum sp.</i> ⁴	4
<i>Avicennia schaueriana</i>	<i>Physarum pezizoideum</i> ¹	5
<i>Conocarpus erectus</i>	<i>Diachea leucopodia</i> ² ; <i>Physarum auriscalpium</i> ¹ ; <i>P. echinosporum</i> ³ ; <i>P. roseum</i> ⁵	6
<i>Laguncularia racemosa</i>	<i>Diachea leucopodia</i> ¹ ; <i>Didymium clavus</i> ¹	2
<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Badhamia sp.</i> ¹ ; <i>Fuligo septica</i> ⁶ ; <i>Physarum sp.</i> ^{1 6} ; <i>Physarum sp.</i> ^{2 6} ; <i>P. auriscalpium</i> ⁵ ; <i>P. roseum</i> ¹ ; <i>P. tenerum</i> ¹	1 7, 8
Não informada	<i>Physarum album</i> ⁶ ; <i>P. polycephalum</i> ⁶	3

*Substrato: 1= casca do tronco vivo. 2=folha do folheto aéreo. 3 = folheto de solo. 4=não informado. 5= raminhos do folheto aéreo. 6 = tronco morto.

**Fontes: 1. Bezerra *et al.*, 1999; 2. Cavalcanti *et al.*, 2000; 3. Novozhilov *et al.*, 2001; 4. Nieves –Rivera 2005; 5. Trierveiler-Pereira *et al.*, 2008; 6. Cavalcanti, I 2014; 7. Agra, I 2015; 8. Cavalcanti *et al.*, 2016.

Tabela 4. Plantas de manguezal utilizadas como substrato para desenvolvimento de mixomicetos da ordem Trichiales.

Planta	Espécie/substrato*	Fonte**
<i>Avicennia germinans</i>	<i>Arcyria cinerea</i> ³ ; <i>Perichaena chrysoesperma</i> ³ ; <i>P. depressa</i> ³	6
<i>Conocarpus erectus</i>	<i>Arcyria cinerea</i> ^{2,4} ; <i>A. denudata</i> ⁴ ; <i>Hemitrichia calyculata</i> ¹ ; <i>Perichaena depressa</i> ⁴	7
<i>Laguncularia racemosa</i>	<i>Arcyria pomiformis</i> ¹ ; <i>Perichaena depressa</i> ¹	3-4-9
<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Arcyria cinerea</i> ^{4,6} ; <i>A. denudata</i> ¹ ; <i>A. incarnata</i> ⁶ ; <i>A. virescens</i> ⁵ ; <i>Hemitrichia serpula</i> ⁶ ; <i>Oligonema flavidum</i> ⁶	1-2-4-5 8-9
Não indicada	<i>Arcyria incarnata</i> ⁶ ; <i>Hemitrichia serpula</i> ³	5

*Substrato: 1= casca do tronco vivo. 2=folha do folheto aéreo. 3=não informado. 4= raminhos do folheto aéreo. 5= raiz viva acima da linha da maré. 6= tronco morto.

**Fontes: 1. Kohlmeyer, 1969; 2. Lee e Baker, 1973; 3. Bezerra *et al.*, 1999; 4. Cavalcanti *et al.*, 2000; 5. Novozhilov *et al.*, 2001; 6. Nieves-Rivera, 2005; 7. Cavalcanti *et al.*, 2014; 8. Agra *et al.*, 2015; 9. Cavalcanti *et al.*, 2016; 10. Kryvomaz e Andrusishina, 2017.

Deve-se considerar a possibilidade dos plasmódios, microcistos, esclerócios e esporos serem capazes de sobreviver na porção periodicamente submersa da vegetação. Estudos empregando novas técnicas, como análises moleculares, que têm permitido acessar a diversidade de fungos e bactérias em seus substratos originais, poderão determinar a presença dos mixomicetos no solo e na vegetação periodicamente submersa, sem necessidade de coletar esporocarpos, propiciando um melhor entendimento da sua diversidade em microhabitats ainda inexplorados no manguezal.

Tabela 5. Plantas de manguezal utilizadas como substrato para desenvolvimento de mixomicetos das ordens Ceratiomyxales, Echinosteliales e Liceales.

Planta	Espécie/substrato*	Fonte**
<i>Avicennia germinans</i>	<i>Cribraria</i> sp. ¹ ; <i>Echinostelium minutum</i> ³	6
<i>Conocarpus erectus</i>	<i>Clastoderma debaryanum</i> ¹ ; <i>Cribraria confusa</i> ¹	7-9
<i>Laguncularia racemosa</i>	<i>Echinostelium</i> aff <i>colliculosum</i> ¹ ; <i>Echinostelium</i> sp. ¹ ; <i>Clastoderma debaryanum</i> ¹ ; <i>Licea</i> sp. ¹ ; <i>L. kleistobolus</i> ¹	3-4
<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Ceratiomyxa</i> sp. ⁵ ; <i>Clastoderma debaryanum</i> ^{2,4} ; <i>Cribraria confusa</i> ¹ ; <i>C. violacea</i> ^{1,4} ; <i>Licea testudinacea</i> ¹ ; <i>Lycogala epidendrum</i> ⁶	1-8 10-12 13
Não informada	<i>Licea scyphoides</i> ³ ; <i>Lycogala conicum</i> ⁶ ; <i>Lycogala epidendrum</i> ⁶	2-11

*Substrato: 1= casca do tronco vivo. 2=folha do folhedo aéreo.3=não informado. 4= raminhos do folhedo aéreo. 5= raiz viva. 6 = tronco morto.

**Fonte:1. Lee e Baker, 1973; 2. Chung *et al.*, 1998; 3. Bezerra *et al.*, 1999;4. Cavalcanti *et al.*, 2000; 6. Nieves –Rivera, 2005; 7. Damasceno *et al.*, 2009; 8. Agra *et al.*, 2010; 9. Cavalcanti *et al.*, 2014; 10. Agra *et al.*, 2015; 11. Savillo; 12. Cavalcanti *et al.*, 2016; 13. Barbosa e Cavalcanti, 2019.

4. Conclusões

Pesquisas de campo e laboratório evidenciam que representantes de todas as subclasses e ordens de mixomicetos podem se desenvolver no ambiente de manguezal, ocupando microhabitats oferecidos, direta ou indiretamente, pelas espécies arbóreas típicas do ecossistema, comportando-se como foliícolas e corticícolas, menos comumente como lignícolas e, raramente, como micetícolas.

Considerando o número de gêneros e espécies, as famílias melhor representadas são Stemonitaceae, Trichiaceae e Physaraceae. Com exceção de *Arcyria cinerea* e *A. denudata*, que ocorrem tanto em manguezais asiáticos como americanos, a maioria das espécies até agora assinaladas têm apenas um ou dois registros, embora muitas sejam cosmopolitas e algumas delas frequentes em outros ecossistemas florestais.

A revisão apresentada neste capítulo deixa evidente que a mixobiota de manguezal necessita ser mais explorada e as informações aqui apresentadas podem constituir ponto de partida para pesquisas direcionadas a uma melhor compreensão do papel dos mixomicetos nesse ecossistema.

5. Referências

- Agra L.A.N.N., Lemos D.B.N., Powell N.V., Medrado W.T., Cavalcanti L.H. 2010. Occurrence of *Lycogala epidendrum* (Myxomycetes) in a mangrove environment in Brazil. *Revista Brasileira de Biociências*, 8(2):164-168.
- Agra L.A.N.N., Bezerra A.C.C., Cavalcanti, L.H. 2015. Myxomycetes from mangroves: species occurring in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75 (4): 222 – 227.
- Ainsworth G., Sparrow, F., Sussman, A. 1973. *The Fungi: An Advanced Treatise*. New York: Academic Press.
- Barbosa D.I., Cavalcanti L.H. 2019. *Licea testudinacea* (Liceales, Myxomycetes) worldwide distribution, a novelty from Mangrove environment. *Nova Hedwigia* (in press)
- Bezerra A.C.C., Brito L.D.B., Guimarães E., Cavalcanti L.H. 1999. *Myxomycetes no manguezal: mixobiota da Reserva Biológica de Santa Isabel, Pacatuba-SE*. 11 Congresso de Iniciação Científica da UFRPE, Recife, Brasil. 4p.
- Cavalcanti L.H., Bezerra A.C.C., Campos E.L. 2000. *Diversidade da mixobiota de Manguezais*. Mangrove 2000: Sustentabilidade de Estuários e Mangues, Desenvolvimento e Perspectivas. Anais da UFRPE, Recife, Brasil.10p.
- Cavalcanti L.H., Damasceno G., Bezerra A.C.C., Costa A.A.A. 2014. Mangrove myxomycetes: species occurring on *Conocarpus erectus* L. (Combretaceae). *Sydowia*, 66: 183-190.

- Cavalcanti L.H., Damasceno G., Costa A.A.A., Bezerra A.C.C. 2016. Myxomycetes in Brazilian mangroves: species associated with *Avicennia nitida*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*. *Marine Biodiversity Records* 9:31.
- Chung C.-H., Liu C.-H., Tzean S.S. 1998. *Myxomycetes from mangrove wetlands of Taiwan*. 4th Conference on Coastal Wetlands Ecology and Conservation. Chinese Wild Bird Federation. 14p.
- Damasceno G., Costa A.A.A., Passavante J.Z.O., Cavalcanti L.H. 2009. *Stemonaria fuscooides* (Stemonitaceae, Myxomycetes): a new record for Brazil. *Mycotaxon*, 108: 205-211.
- Damasceno G., Tenorio J.C.G., Cavalcanti L.H. 2011. Stemonitaceae (Myxomycetes) in Brazilian mangroves. *Sydowia*, 63(1): 9-22.
- Everhart S.E., Keller H. 2008. Life history strategies of corticolous Myxomycetes: the life cycle, plasmodial types, fruiting bodies, and taxonomic orders. *Fungal Diversity*, 29:1-16.
- Ferreira A.C., Lacerda, L.D. 2016. Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectives. *Ocean & Coastal Management*, 125: 38-46.
- Ing B. 1994. The phytosociology of myxomycetes. *New Phytologist*, 126:175-201.
- Ing B., Hnatiuk R.J. 1981. Myxomycetes of Aldabra Atoll. *Atoll Research Bulletin*, 249: 1-10.
- Kohlmeyer J. 1969. Ecological notes on fungi in mangrove forests. *Transactions of the British Mycological Society*, 53(2): 237-250.
- Kryvomaz T., Andrusishina I. 2017. Assessment of mangrove environmental safety by analyzes of metals transition. *Useful* 1(2): 1-9.
- Lado, C. 2005-2019. An on-line nomenclatural information system of Eumycetozoa. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. <http://www.nomen.eumycetozoa.com/>. Acesso em 14 julho 2019.
- Lee B.K.H., Baker G.E. 1973. Fungi associated with the roots of red mangrove, *Rhizophora mangle*. *Mycologia*, 65: 894-906.
- Lemos, D.B.N. MacArthur, R.H. 1962. Some generalized theorems of natural selection. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 48: 1893-1897.
- Maia L.P., Lacerda L.D., Monteiro L.H.U., Souza G.M. 2005. Estudo das áreas de manguezais do Nordeste do Brasil: avaliação das áreas de Manguezais dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Universidade Federal do Ceará – Instituto de Ciências do Mar / Sociedade internacional para ecossistemas de Manguezal.
- Ministério do Meio Ambiente. 2018. *Atlas dos manguezais do Brasil*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 176 p.
- Nieves-Rivera A.M. 2005. *Coastal mycology of Puerto Rico: A survey and biological aspects of marine, estuarine and mangrove fungi*. Porto Rico. (PhD Thesis, University of Puerto Rico). 360p.
- Nieves-Rivera A.M., Stephenson S.L. 2004. The occurrence of *Stemonitis splendens* (Myxomycota: Stemonitales) on *Rhizophora mangle*. *Caribbean Journal of Science*, 40(2): 273-276.
- Novozhilov Y.K., Schnittler M., Rollins A.W., Stephenson S.L. 2001. Myxomycetes from different forest types in Puerto Rico. *Mycotaxon*, 77: 285-299.
- Rojas C., Rollins A.W., Stephenson, S.L. 2014 Distribution of myxomycetes among the microhabitats available for these organisms in tropical forests. In: J. K. Misra, Jalpa P. Tewari, Sunil Kumar Deshmukh, Csaba Vágvölgyi (Eds). *Fungi from different substrates*. Cap. 6.
- Savillo I.A.T. 2015. A short note: *Lycogala* spp. in mangroves: An update and an introduction to foliimortuumous myxomycetes. *Journal of Wetlands Biodiversity*, 5: 47-49.
- Stephenson S.L., Rojas C. 2017. *Myxomycetes: Biology, Systematics, Biogeography, and Ecology*. Elsevier, 437p.
- Trierveiler-Pereira L., Baltazar, J.M., Loguercio-Leite C. 2008. Santa Catarina Island mangroves – First report of Myxomycetes on *Avicennia schaueriana*. *Mycotaxon*, 103: 145-152.

Aspectos ecológicos da mixobiota em diferentes fitofisionomias do Cerrado

XAVIER-SANTOS, Solange; MOREIRA, Izabel Cristina; ARAÚJO, Jéssica Conceição;
LEONARDO-SILVA, Lucas

Laboratório de Micologia Básica, Aplicada e Divulgação Científica - FungiLab. Universidade Estadual de Goiás (RENAC/UEG), Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas
Email: solange.xavier@ueg.br

Resumo

Foram investigados aspectos ecológicos da comunidade de mixomicetos de diferentes fitofisionomias de duas unidades de conservação (UC) do Bioma Cerrado: a Floresta Nacional de Silvânia (FLONA), no município de Silvânia e a Reserva Ecológica da UEG (REC/UEG), em Anápolis, ambas no estado de Goiás, Brasil. Na primeira UC foram amostradas as fitofisionomias cerradão e mata de galeria e na segunda, mata de galeria e mata mesófila. A amostragem de mixomicetos na REC/UEG foi baseada na coleta de esporocarpos no campo, e na FLONA, os esporocarpos foram obtidos a partir da coleta e incubação de substratos em câmara úmida. As comunidades de mixomicetos foram comparadas, utilizando-se as abordagens de avaliação ecológica (abundância, riqueza, diversidade, similaridade e equabilidade). Na FLONA, foram obtidos 32 espécimes, distribuídos em 18 espécies, 13 gêneros e seis famílias; na REC/UEG foram 58 espécimes, 19 espécies, 10 gêneros e oito famílias. Em ambas as UC, a mata de galeria apresentou a maior riqueza e maior índice de diversidade de Shannon-Wiener e de Simpson. A REC/UEG apresentou maior similaridade entre as suas fitofisionomias ($S_s = 0,54$) do que a FLONA ($S_s = 0,28$). Os dados sugerem que o tipo fitofisionômico afeta a comunidade de mixomicetos, de modo que a mata de galeria é a mais propícia ao desenvolvimento desses organismos, possivelmente com maior disponibilidade de microhabitats favoráveis. Este trabalho traz os primeiros subsídios para novas abordagens ecológicas sobre mixomicetos em fitofisionomias do Cerrado, contribuindo para o seu monitoramento dentro de biomas específicos, como é o caso do Cerrado.

Palavras-chave: Diversidade, Ecologia, Myxomycetes.

1. Introdução

Os estudos sobre os mixomicetos em países neotropicais vêm aumentando nos últimos anos, ainda que prevaleçam aqueles de natureza taxonômica. As pesquisas de abordagens ecológicas estão concentradas no México e na Costa Rica (Rojas e Stephenson, 2008; Estrada-Torres *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2011; Rojas e Valverde, 2015). No Brasil, praticamente não há informações sobre a ecologia desses organismos, sendo que os poucos trabalhos que pontuam aspectos ecológicos são focados nos tipos de habitats (substratos) utilizados por eles (Rufino e Cavalcanti, 2007; Ferreira e Cavalcanti, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2016; Lima e Cavalcanti, 2017).

O Brasil é composto por diversas formações vegetacionais e, entre estas, encontra-se o bioma Cerrado, que ocupa 24% do território brasileiro e é apontado como a savana tropical mais rica do mundo (Aguiar *et al.*, 2004; Klink e Machado, 2005). Atualmente são conhecidas 246 espécies de mixomicetos no Brasil; cerca de 40% delas são descritas para o Cerrado (Cavalcanti, 2019). O Cerrado é caracterizado por diversas formas fitofisionômicas, constituindo um mosaico vegetacional, onde estão presentes fisionomias com formações do tipo savana, a qual está subdividida em cerradão, cerrado *sensu stricto*, campo sujo e campo limpo, intercalados por matas de galeria, florestas estacionais, campos rupestres e veredas de buritis (Ribeiro e Walter, 2008). Este trabalho teve por objetivo investigar comparativamente a mixobiota em diferentes fitofisionomias do Cerrado, considerando diferentes parâmetros ecológicos.

2. Metodologia

2.1. As áreas estudadas

Os estudos foram conduzidos em duas Unidades de Conservação (UC) do Cerrado, a Floresta Nacional (FLONA) de Silvânia, e a Reserva Ecológica da Universidade Estadual de Goiás (REC/UEG) (Figura 1). A FLONA é uma UC de uso sustentável e está localizada entre as coordenadas 16°38'30, 46" S e 48°39'3, 11 "W, no município de Silvânia, na região leste do estado de Goiás, a 88 km de Goiânia, a capital do estado e 177 km de Brasília, a capital do país (Figura 1). Ocupando uma área de 466,55 hectares, e com aproximadamente 900m de altitude, a FLONA é constituída pelas fitofisionomias cerrado *sensu stricto*, mata mesófila, cerradão, campo sujo, vereda, mata semidecídua e mata de galeria (Plano de manejo FLONA, 2012). Nesta área, foram estudadas as fitofisionomias mata de galeria e cerradão. A mata de galeria é caracterizada por uma paisagem associada aos cursos d'água dos córregos Estiva, ao norte; Marinho, a leste e o Rio vermelho, ao sul; formando um corredor fechado com predominância de espécies arbóreas que formam um dossel contínuo. O cerradão é constituído de vegetação com características esclerófilas, de grande variação no estrato arbóreo, incluindo estratos arbustivos e herbáceos, influenciados pelas condições de luminosidade.

A REC/UEG, também conhecida como "Trilha do Tatu", está localizada dentro das dependências do *campus* de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), situado no município de Anápolis, estado de Goiás, às margens



Figura 1. Localização das áreas estudadas. O tracejado representa a área de distribuição do bioma Cerrado em território brasileiro e os pontos a localização das unidades de conservação amotradas. REC/UEG = Reserva Ecológica da Universidade Estadual de Goiás. FLONA = Floresta Nacional de Silvânia.

do Km 98 da BR153, entre os paralelos 16°23'40"S e 48°57'32"W. Possui aproximadamente 15 hectares, cortados transversalmente pelo córrego Barreiro, e é coberta por vegetação nativa do bioma Cerrado, incluindo fragmentos de formações florestais: mata de galeria, mata mesófila, cerrado ralo e uma área de pasto abandonado, sendo que grande parte da área é formada por cerrado *sensu stricto*. Nesta área foram estudadas as fitofisionomias mata de galeria e mata mesófila. A mata de galeria é caracterizada por uma vegetação arbórea que margeia o córrego Barreiro e não apresenta caducifolia durante a estação seca. A mata mesófila, também referida como mata seca ou semidecídua, apresenta diversos níveis de caducifolia na estação seca.

2.2. Amostragem de mixomicetos

Para a amostragem de mixomicetos nas áreas estudadas, foram lançadas aleatoriamente 5 parcelas de 25 m² (5x5 m), nos primeiros 100 m adentrando a vegetação na FLONA, e ao longo de um transecto de 150 m da borda para o interior na REC/UEG. Na FLONA foram coletadas amostras de substratos nos vértices de cada parcela. Na REC/UEG, cada parcela foi explorada por 15 min para a coleta de amostras de esporocarpos visualizados em campo.

2.3. Tratamento das amostras

No laboratório, cada amostra de substrato procedente da FLONA foi fracionada em três réplicas, e estas incubadas em câmara úmida, conforme metodologia utilizada por Stephenson e Stempen (1994). Estas câmaras úmidas foram monitoradas duas vezes por semana, durante três meses, quanto ao surgimento de esporocarpos de mixomicetos. Esses esporocarpos obtidos em câmara úmida, bem como aqueles coletados diretamente em campo na REC/UEG, foram acondicionados em caixinhas de papelão, fotografados sob estereomicroscópio e microscópio óptico, caracterizados quanto à macro e micromorfologia, identificados taxonomicamente e herborizados, integrando o acervo de mixomicetos do herbário HUEG.

2.4. Análise ecológica

Para cada fitofisionomia estudada, foram determinados: frequência absoluta e relativa de cada espécie, riqueza, composição de espécies, tipo de esporocarpo, índice de Shannon-Wiener, índice de Simpson e a Equabilidade de Pileou.

O Índice de Shannon-Wiener (H') foi obtido segundo a relação $H' = -\sum p_i \ln(p_i)$, onde:

p_i = proporção da i -ésima espécie;

\ln = logaritmo natural ou neperiano;

p_i é obtido pela relação $p_i = n_i/N$, onde:

n_i = número de indivíduos da espécie i ;

N = número total de indivíduos amostrados.

Para o Índice de Simpson (D'), foi considerado $D' = 1/\sum P_i^2$, onde:

p_i = abundância relativa (proporção) da espécie i na amostra

$p_i = n_i / N$

n_i = número de indivíduos amostrados da i -ésima espécie;

N = número total de indivíduos amostrados;

Para a Equabilidade de Pileou (E'), $E' = H'/\ln$, onde:

H' = índice de diversidade de Shannon

\ln = número total de espécies amostradas.

Para aferir o padrão de semelhança entre as áreas, foi considerado o Índice de Sørensen (S_s), em que $S_s = 2c/(a+b)$, onde:

a = número total de espécies na área 1;

b = número total de espécies na área 2;

c = número de espécies comuns entre as áreas 1 e 2.

3. Resultados e Discussão

Na FLONA, foram obtidos 31 espécimes e 18 espécies, as quais estão distribuídas em 14 gêneros, sete famílias e seis ordens. Destas espécies, três foram comuns a ambas as fitofisionomias, cinco ocorreram exclusivamente em cerradão e nove exclusivamente em mata de galeria. *Arcyria cinerea* foi a espécie mais frequente (Tabelas 1 e 2). Cerca de 73% das espécies encontradas apresentam esporocarpos do tipo esporângio, 12% plasmodiocarpo, 5% colunar, 5% etálio e 5% pseudoetálio; sendo que na mata galeria 67% é do tipo esporângio, 17% plasmodiocarpo, 8% etálio e 8% pseudoetálio; no cerradão, 89% é do esporângio e 11% colunar (Figura 2 A).

Na REC/UEG foram obtidos 58 espécimes e 19 espécies, as quais estão distribuídas em 10 gêneros, oito famílias e cinco ordens. Destas espécies, sete foram comuns a ambas as fitofisionomias, sete exclusivas à mata de galeria e cinco exclusivas à mata mesófila. As espécies mais frequentes foram *A. denudata*, *Ceratiomyxa fruticulosa*, *Hemitrichia calyculata* e *Physarum album* (Tabelas 1 e 2). Cerca de 80% das espécies possuem esporocarpos do tipo esporângio, 5% etálio, 5% colunar, 5% pseudoetálio e 5% plasmodiocarpo. Na mata de galeria 74% são do tipo esporângio, 18% plasmodiocarpo e 8% colunar; na mata mesófila 75% são do tipo esporângio, 17% plasmodiocarpo e 8% colunar (Figura 2B).

Tabela 1. Distribuição das espécies de mixomicetos encontradas em duas Unidades de Conservação do Cerrado, a Floresta Nacional de Silvânia (FLONA) e a Reserva Ecológica da Universidade Estadual de Goiás (REC/UEG), segundo a posição taxonômica e o padrão de ocorrência nas fitofisionomias estudadas. CE = Cerradão, MG = Mata de galeria, MM = Mata mesófila. Valores numéricos = abundância de espécies.

Ordem	Família	Espécies	Frequência			
			FLONA		REC/UEG	
			CE	MG	MG	MM
Ceratiomyxales	Ceratiomyxaceae	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i>	2		4	5
Echinistiales	Clastodermataceae	<i>Clastoderma debaryanum</i>	1			
Liceales	Cribrariaceae	<i>Cribraria cf. intricata</i>				1
		<i>C. microcarpa</i>	2			
Physarales	Reticulariaceae	<i>Lycogala epidendrum</i>			2	
		<i>Diderma effusum</i>		1		
	Didymiaceae	<i>Didymium cf. clavus</i>		1		
		<i>D. iridis</i>			1	
		<i>D. squamulosum</i>			2	
		<i>D. nigripes</i>		1		
Physaraceae	<i>Physarum album</i>		1	4	3	
	<i>P. nucleatum</i>				1	
	<i>P. viride</i>	1	1	2	1	
	<i>Physarum sp.</i>				1	
	<i>Arcyria cinerea</i>	5	2	3	1	
Trichiales	Arcyriaceae	<i>A. denudata</i>		2	6	3
		<i>Hemitrichia calyculata</i>			6	1
	Trichiaceae	<i>H. serpula</i>			1	2
		<i>Metatrachia vesparium</i>		1	2	
		<i>Perichaena calongei</i>		2		
		<i>P. chrysosperma</i>		1		
		<i>Trichia cf. papillata</i>			2	
Stemonitales	Stemonitidaceae	<i>Comatracha elegans</i>	1			
		<i>Enerthenema papillatum</i>	1			
		<i>Paradiacheopsis longipes</i>		1		
		<i>Stemonitis fusca</i>			1	
		<i>Stemonitis cf. virginensis</i>	3			
		<i>Stemonitis sp1</i>				1
		<i>Stemonitis sp2</i>			1	
		<i>Stemonitis sp3</i>				1
<i>Stemonitopsis cf. hyperopta</i>	1	1				

Tabela 2. Dados ecológicos das comunidades de mixomicetos em duas Unidades de Conservação do Cerrado, a Floresta Nacional de Silvânia (FLONA) e a Reserva Ecológica da Universidade Estadual de Goiás (REC/UEG). CE = Cerradão, MG = Mata de galeria, MM = Mata mesófila.

Dados ecológicos	Unidades de Conservação					
	FLONA			REC/UEG		
	CE	MG	Total	MG	MM	Total
Abundância	17	15	32	37	21	58
Riqueza	9	12	18	14	12	19
Espécies comuns a ambas fitofisionomias	27%			37%		
Espécies exclusivas	50%	33%		36%	26%	
Espécies mais frequentes	<i>Arcyria cinerea</i>			<i>Arcyria denudata</i> <i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> <i>Hemitrichia calyculata</i> <i>Physarum album</i>		
Índice de Shannon-Wiener (H')	2	2,4		2,2	1,9	
Índice de Simpson (D')	0,8	0,9		0,9	0,8	
Equabilidade de Pielou (E')	0,9	0,9		0,9	0,9	
Similaridade de Sørensen (Ss)		0,28			0,54	

No que diz respeito aos parâmetros ecológicos avaliados, a comparação entre as diferentes fitofisionomias amostradas mostrou riqueza e índice de diversidade (Índice de Shannon-Wiener e Índice de Simpson) maior na mata de galeria, do que nas outras fitofisionomias (Tabela 2). A Equabilidade de Pielou não diferiu entre as fitofisionomias e o valor estimado ($E' = 0.9$) indica uniformidade na distribuição indivíduos/espécies (Magurran, 1988).

A REC/UEG apresentou maior similaridade entre as suas fitofisionomias ($Ss = 0,54$), do que a FLONA ($Ss = 0,28$) (Tabela 2). Segundo Stephenson (1989), o valor desse índice varia de 0 a 1, sendo que 0 indica que não há espécies comuns a ambas as localidades comparadas, portanto, não existe similaridade, por outro lado, quanto mais próximo de 1, maior é a similaridade entre as localidades.

Em ambas as UCs estudadas, a mata de galeria apresentou maior índice de diversidade, frequência e riqueza de espécies do que a mata mesófila e o cerradão (Tabela 2). Esses resultados são semelhantes àqueles encontrados em estudos envolvendo outros grupos taxonômicos também influenciados pelas condições microclimáticas, como líquens e briófitas. Rodrigues e Carregaro (2013) coletaram 175 exemplares de líquens em duas

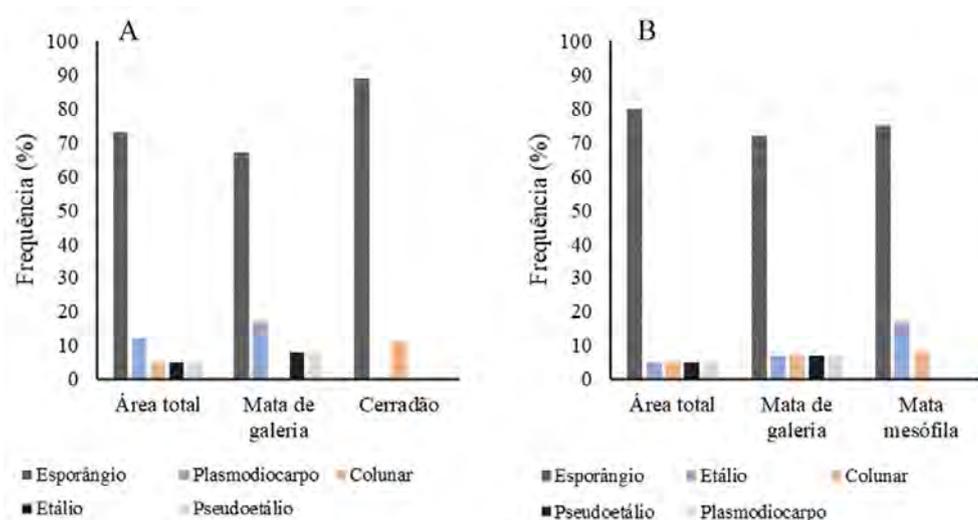


Figura 2. Distribuição dos tipos de esporocarpos encontrados nas áreas estudadas. A: Floresta Nacional de Silvânia (FLONA), B: Reserva Ecológica da Universidade Estadual de Goiás (REC/UEG).

fitofisionomias de Cerrado, em Cristalina-GO, sendo 140 encontrados em mata de galeria e 35 em campo sujo. Rios *et al* (2016) estudaram a diversidade de briófitas em quatro fitofisionomias de Cerrado, na Área de Proteção Ambiental Morro do Macaco, no município de Iporá-GO, encontrando 37 espécies, sendo 16 em mata de galeria, 14 em mata mesófila, 11 em cerrado rupestre e 8 em campo rupestre.

Mesmo utilizando-se metodologias de amostragem distintas, as UCs estudadas apresentaram alta similaridade em relação ao número de espécies ($S_s = 0,54$), mas divergiram em relação à composição de espécies, compartilhando apenas 6 espécies em comum, sendo que dessas espécies comuns, quase todas eram comuns ao tipo fitofisionômico comum a ambas, a mata de galeria. Ao comparar o cerradão com a mata mesófila, apenas 2 espécies foram comuns. Isso evidencia que a composição florística e a consequente condição ambiental determinada pela fitofisionomia condiciona a comunidade de mixomicetos. Em todas as fitofisionomias amostradas, houve predomínio de esporocarpos do tipo esporângio, sendo ainda mais evidente no cerradão.

4. Considerações finais

Os resultados obtidos mostraram que a fitofisionomia interfere na comunidade de mixomicetos, mesmo alterando a metodologia de amostragem e a localidade amostrada, a mata de galeria se mostrou mais propícia ao desenvolvimento desses organismos, pois os parâmetros de riqueza, abundância e diversidade foram superiores nesta fitofisionomia do que na mata mesófila ou no cerradão. Possivelmente isso se deva a maior disponibilidade de microhabitats favoráveis proporcionados nesse ambiente, tais como, maior taxa de umidade, sombreamento e diversidade de substratos, os quais seriam decorrentes da presença de curso d'água e da maior densidade de espécies arbóreas. Estes são os primeiros estudos sobre a ecologia de mixomicetos no bioma Cerrado, o que fornecerá subsídios para novas pesquisas com essa abordagem, contribuindo para o monitoramento destes organismos dentro de biomas específicos, como é o caso do Cerrado.

Agradecimentos

À Capes, pela bolsa de doutorado concedida a L. Leonardo-Silva e à FAPEG, pela bolsa de mestrado concedida à I. C. Moreira.

5. Referências

- Aguiar L.M.S., Machado R.B., Marinho-Filho J. 2004. *A diversidade biológica do Cerrado*. In: Aguiar L.M.S., Camargo A. (eds.). *Ecologia e caracterização do Cerrado*. pp. 19-42. Empresa Brasileira de Pesquisa, Embrapa Cerrados.
- Basanta D. W., Lado C., Estrada-Torres, A. 2008. Morphology and life cycle of a new species of *Didymium* (Myxomycetes) from arid areas of Mexico. *Mycologia*, 100(6): 921-929.
- Bezerra M.F.A., Silva W.M.T., Cavalcanti L.H. 2008. Coprophilous myxomycetes of Brazil: first report. *Revista Mexicana de Micologia*, 27: 29-37.
- Cavalcanti L.H., Damasceno G., Costa A.A.A., Bezerra A.C.C. 2016. Myxomycetes in Brazilian mangroves: species associated with *Avicennia nitida*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*. *Marine Biodiversity Records*, 9(1): 1-31.
- Cavalcanti L.H. 2019. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [on line]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> Acesso em: 11 julho. 2019.
- Estrada-Torres A., Wrigley de Basanta D., Conde E., Lado C. 2009. Myxomycetes associated with dryland ecosystems of the Tehuacán-Cuicatlán Valley Biosphere Reserve, Mexico. *Fungal Diversity* 36:17-56.
- Ferreira I.N., Cavalcanti L.H. 2011. Myxomycetes associados a cactáceas no agreste e sertão de Pernambuco, Brasil. *Biotemas*, 24:1-11.
- Klink C.A., Machado R.B.A. 2005. Conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1: 147-155.
- Lima V.X., Cavalcanti L.H. 2017. Diversity and ecology of Myxomycetes in the PampaBiome, Brazil. *Nova Hedwigia*, 104: 273-291.

- Magurran A.E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey. 179p.
- Plano de manejo da Floresta Nacional de Silvânia*. Diagnóstico Ambiental. Brasília - DF. v.1. 2012.
- Ribeiro J.F., Walter B.M.T. 2008. *As principais fitofisionomias do bioma Cerrado*. In: Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF. *Cerrado: Ecologia e Flora, Brasília: Embrapa Cerrados: Embrapa informação tecnológica*, 152-212.
- Rios A.B.M., Oliveira J.P.S., Silva R.P., Neto J.F.O. 2016. Bryophyte diversity in an area of Brazilian Cerrado in Central-West. *Neotropical Biology and Conservation*, 11(3):132-140.
- Rodrigues L.C., Carregaro J.B. 2013. Análise morfológica de líquens corticícolas em duas fitofisionomias do Cerrado em Cristalina-GO. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 17(6): 17-25.
- Rojas C., Stephenson S.L. 2007. Distribution and ecology of myxomycetes in the high-elevation oak forests of Cerro Bellavista, Costa Rica. *Mycologia*, 99(4):534-543.
- Rojas C., Stephenson S.L. 2008. Myxomycete ecology along an elevation gradient on Cocos Island, Costa Rica. *Fungal Diversity*, 29: 117-127.
- Rojas C., Stephenson S.L., Huxel G. 2011. Macroecology of high-elevation myxomycete assemblages in the northern Neotropics. *Mycological Progress*, 10: 423-437.
- Rojas C., Valverde R. 2015. Ecological patterns of lignicolous myxomycetes from two different forest types in Costa Rica. *Nova Hedwigia*, 101(1-2), 21-34.
- Rufino M.U.L., Cavalcanti L.H. 2007. Alterations in the lignicolous myxomycete biota over two decades at the DoisIrmãos Ecologic State Reserve, Recife, Pernambuco, Brazil. *Fungal Diversity*, 24: 159 - 171.
- Stephenson S.L. 1989. Distribution and ecology of myxomycetes in temperate forests. II. Patterns of occurrence on bark surface of living trees, leaf litter, and dung. *Mycologia*, 81: 608-621.
- Stephenson S.L., Stempen H. 1994. *Myxomycetes: a handbook of slime molds*. Timber Press, Portland, Oregon.

Atividade antimicrobiana em metabólitos produzidos por mixomicetos

RIBEIRO, Sheyla Mara de Almeida¹; SILVA, Nicácio Henrique³; PEREIRA, Eugênia Cristina³;
RIBEIRO, Marcio Rubens², ANDRADE, Laise de Holanda Cavalcanti³

¹Laboratório de Biossíntese de Substâncias Antimicrobianas, Universidade Federal do Pará

²Hospital Ophir Loyola

³Universidade Federal de Pernambuco

Email: sheylaribeiro@hotmail.com

Resumo

Os mixomicetos constituem um grupo com metabolismo muito particular que sintetizam metabólitos de grande interesse por apresentarem atividades biológicas variadas, como é o caso da atividade antimicrobiana. Apesar do seu potencial biológico, são relativamente pouco explorados do ponto de vista químico e biológico. Visando detectar atividade antimicrobiana e gerar maior conhecimento sobre os mixomicetos, este estudo objetivou isolar, identificar e testar a atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo plasmódio de *Physarella oblonga*. Extratos orgânicos foram obtidos por imobilização plasmoidal e submetidos a testes químicos e biológicos para avaliar a composição química e o potencial antimicrobiano da espécie. Os testes de cromatografia em camada delgada revelaram a presença de antraquinona e β -sitosterol. Os resultados de cromatografia líquida de alta eficiência confirmaram a presença de antraquinona e a revelação com reagentes específicos confirmaram a presença de β -sitosterol, bem como detectaram polifenóis no extrato bruto de *Physarella oblonga*. O fracionamento do extrato permitiu isolar duas bandas cromatográficas, com Rf 53 (Fração A) e 30 (Fração B), sendo esta identificada, através de reveladores específicos, como pertencente à classe dos polifenóis. Os testes antimicrobianos demonstraram que *Physarella oblonga* produz metabólitos com grande potencial antibiótico, uma vez que inibiram bactérias e fungos de interesse clínico, como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, e amplo espectro de ação, inibindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistente e fungos leveduriformes.

Palavras-chave: Myxomycetes, Metabolismo secundário, Metabólitos antimicrobianos.

1. Introdução

Os mixomicetos sintetizam metabólitos de grande interesse por apresentarem atividades biológicas variadas, como anticancerígena, antioxidante, antiparasitária e antimicrobiana (Huynh *et al.*, 2017). Estes metabólitos bioativos podem ser utilizados como matéria prima para a produção de novos fármacos, o que faz dos mixomicetos um excelente material para pesquisas nessa área.

Uma das linhas que vem avançando nos últimos anos é a pesquisa por metabólitos com ação antimicrobiana. Isto em função do grave problema de saúde pública que se enfrenta atualmente, a resistência microbiana aos antibióticos utilizados na clínica médica, o que vem gerando a necessidade de novos produtos no mercado farmacêutico (Murray *et al.*, 2016; Tortora *et al.*, 2017). Essa necessidade aumentou o interesse nas pesquisas por produtos naturais focando, principalmente, em grupos de organismos ainda pouco explorados.

Neste sentido, os mixomicetos constituem um grupo inovador, pois desenvolvem um metabolismo muito particular que sofre influência dos diferentes estágios do seu ciclo de vida e das rápidas respostas que apresentam a variações ambientais bióticas e abióticas (Wang *et al.*, 2017).

Dentre as classes de metabólitos mais promissoras, do ponto de vista antimicrobiano, encontram-se alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, entre outros compostos de natureza fenólica, resultantes do metabolismo secundário dos mixomicetos (COSTA, 2017). Apesar do seu potencial, estudos sobre a natureza química e a atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos por mixomicetos são relativamente raros. Os primeiros

a detectarem esta atividade foram Locquin e Prévot (1948) ao avaliarem substâncias produzidas por algumas espécies de mixomicetos, entre as quais *Fuligo septica* (L.) Wigg., cujos princípios ativos foram reportados como antraquinonas e denominados de fuligóides E e H.

A partir daí, alguns trabalhos foram desenvolvidos, como os de Sobels (1950), Hashimoto *et al.* (1994), Chiappeta *et al.* (1999), Herrera *et al.* (2011) e Costa (2017), entre outros. A maioria desses trabalhos foi realizada com esporocarpos de mixomicetos, o que dificulta a obtenção de metabólitos em quantidade suficiente para dar sequência aos testes necessários para sua identificação e possível aplicação medicinal, uma vez que o esporocarpo é uma fase onde o metabolismo encontra-se reduzido e restringe-se, em grande parte, ao acúmulo de substâncias produzidas durante a fase plasmodial, limitando assim a continuidade dos estudos.

Visando contribuir com o estudo dos mixomicetos e levando em consideração o potencial antimicrobiano de algumas espécies, como *Physarella oblonga* (Berk. & M. A. Curtis) Morgan, para a qual já foram referidos compostos com atividade antimicrobiana (Nair e Zabka, 1966; Ribeiro *et al.*, 2002), e considerando-se ainda que a fase plasmodial é a mais promissora na síntese desses compostos, objetivou-se nesse estudo isolar e identificar metabólitos antimicrobianos a partir de extratos plasmodiais de *Physarella oblonga*.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e Condições de cultivo

O faneroplasmódio de *Physarella oblonga*, coletado em seu ambiente natural, foi cultivado em câmara-úmida sobre papel de filtro umedecido com água destilada estéril, sendo mantido à temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ \text{C}$), na ausência de luminosidade e em pH variando de 4,5 a 5,0, durante um mês, de acordo com Ribeiro *et al.* (2003). Neste período, foram realizadas transferências semanais do plasmódio, de uma câmara-úmida a outra, sendo, a cada transferência, adicionado 5 mg de flocos de aveia esterilizados, utilizados como fonte de alimento. Após um mês de cultivo, 30 mg da biomassa úmida do plasmódio foram imersas em 4 mL de meio líquido (extrato de malte 3%), e mantidas em agitação por 1 min a 400 rpm. Os fragmentos plasmodiais assim obtidos foram submetidos a um processo de imobilização, utilizando-se 10 g caulinita como matriz de enclausuramento, e 25 mL de acetato de sódio 1 mM (pH=4,5), como precursor metabólico (RIBEIRO *et al.*, 2003). O experimento de imobilização foi mantido à temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ \text{C}$), na ausência de luminosidade e sob oxigenação constante.

2.2. Extração orgânica

Eluatos plasmodiais foram obtidos durante um mês, sendo coletados diariamente, nos primeiros 7 dias, passando, posteriormente, para coletas semanais até o final do experimento (Ribeiro *et al.*, 2003). Os eluatos foram submetidos à extração orgânica com 25 mL de éter/acetato de etila (65:35 v/v) em pH 4,5 (Pereira *et al.*, 1995). Os extratos obtidos a partir de cada eluato plasmodial foram reunidos e evaporados à temperatura ambiente ($25^\circ \text{C} \pm 3^\circ \text{C}$) até peso constante, resultando em um único extrato plasmodial bruto.

2.3. Análise química

2.3.1. Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sephadex LH-20, de modo a obter frações isoladas. A coluna foi empacotada com acetato de etila e eluída, inicialmente, com esta fase móvel, passando-se, em seguida, para metanol. A fração obtida com acetato de etila foi recromatografada duas vezes, no mesmo solvente, até obtenção de uma fração pura (Fração A). A fração metanólica foi também recromatografada duas vezes com metanol/acetato de etila (70:30 v/v), obtendo-se outra fração (Fração B).

2.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato bruto (2 mg/mL) e as frações A e B isoladas (1 mg/mL) foram cromatografadas em placa de sílica gel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ (Merck), utilizando-se como eluente o sistema de solventes tolueno/acetato de etila/ácido fórmico

(8,0:1,5:0,5 v/v/v). Como referência, foram utilizados os padrões antraquinona e β -sitosterol. As bandas obtidas no cromatograma foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 366 nm e, em seguida, reveladas com ácido sulfúrico a 10%, em aquecimento a 100°C por 10 min.

2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para os ensaios em CLAE, o extrato bruto (1 mg. mL⁻¹), as frações isoladas (0,1 mg.mL⁻¹) e o padrão antraquinona (0,1 mg.mL⁻¹) foram injetados em cromatógrafo líquido HITACHI, acoplado a um detector de UV da marca CG a 266 nm. As condições de análise consistiram em coluna de fase reversa RP18, com volume de injeção de 20 μ L; fase móvel: metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v); fluxo de 1,0 mL.min⁻¹; temperatura ambiente (25 \pm 3 °C) e atenuação 6,0 (Legaz e Vicente, 1983).

2.3.4. Determinação da natureza química dos metabólitos

O extrato bruto e as frações isoladas foram analisados por cromatografia em camada delgada, desenvolvida com sistemas e reagentes específicos, conforme o grupo químico pesquisado (Araújo, 2002). Os compostos pesquisados foram: alcaloides, esteroides e polifenóis. A tabela 1 apresenta o procedimento estabelecido para cada grupo químico.

Tabela 1. Grupos químicos pesquisados em extratos plasmodiais de *Physarella oblonga* e respectivos sistemas de eluição e revelação.

Grupos Químicos	Sistema Eluente	Revelação
Alcaloides (Pilocarpina)	Tolueno/Acetato de etila/Ácido fórmico (80:15:5 v/v/v)	Dragendorff (Wagner & Bladt, 1996)
Esteroides (β -sitosterol)	Tolueno/Acetato de etila (90:12 v/v)	Liebermann (Wagner & Bladt, 1996)
Polifenóis Flavonoides (Quercetina)	Tolueno/Acetato de etila/Ácido fórmico (80:15:5 v/v/v)	NEU (Wagner & Bladt, 1996)

2.4. Atividade antimicrobiana

Os testes antibacterianos foram realizados com cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC) e do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Cepas de *Staphylococcus aureus* Rosenbach (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (UFPEDA 16), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 9027), *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers (ATCC 25922) e *Mycobacterium phlei* Lehmann & Neumann (UFPEDA 71), foram utilizadas como representantes de bactérias Gram positivas, Gram negativas e álcool-ácido resistentes. No grupo de fungos leveduriformes, foram testados isolados clínicos de *Candida albicans* (Robin) Berkhout e *Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout.

Os ensaios foram realizados em triplicata, através do teste de difusão em meio sólido, segundo Bauer *et al.* (1966). Discos de papel (6 mm ϕ) foram impregnados com 25 μ L do extrato bruto e das frações isoladas, na concentração de 1 mg/mL e 2 mg/mL, ajustados a pH 7,0. Em seguida, os discos foram depositados em placas de Petri (9 cm ϕ) contendo 15 mL de meio agar Müeller-Hinton previamente inoculado com 50 μ L de cada suspensão microbiana na concentração de 10⁷ UFC/mL. Discos impregnados com os respectivos solventes utilizados na solubilização dos extratos e frações foram aplicados como controle negativo. Como controle positivo, foram utilizados os antibióticos Cefalotina (30 μ g) e Amicacina (30 μ g) nos ensaios antibacterianos, e Anfotericina B (100 μ g) nos ensaios antifúngicos.

As placas de Petri foram mantidas sob refrigeração a 8 °C, durante 24 h (Chiappeta *et al.*, 1999). Após este período, foram incubadas a 30 °C e 37 °C, respectivamente, para leveduras e bactérias, durante 24 h. Os resultados foram avaliados pelas medidas dos halos de inibição formados em torno dos discos e expressos pela média das três repetições.

3. Resultados e Discussão

O cromatograma (CCD) do extrato bruto do plasmódio de *Physarella oblonga* revelou a presença de sete bandas cromatográficas, com valores de Rf (x100) = 69, 62, 53, 47, 30, 22 e 9. O fracionamento do extrato forneceu duas frações significativas, segundo a polaridade da fase móvel empregada; sendo que a fração eluída com acetato de etila isolou a banda com Rf 53 (Fração A) e a eluição metanólica a 70% isolou a banda com Rf 30 (Fração B). Os padrões antraquinona e β -sitosterol, utilizados como referência, apresentaram valores de Rf e coloração compatíveis com as bandas de Rf 69 e 47, respectivamente (Figura 1).

A análise do extrato bruto por CLAE, revelou três picos de absorção, com tempos de retenção (Tr) de 2,94 min, 5,98 min e 8,31 min. O primeiro corresponde ao Tr do metanol, sendo, portanto, detectadas apenas dois metabólitos, um com Tr=5,98 e outro com Tr=8,31, o qual coincidiu com o Tr do padrão antraquinona aplicado como referência (Figura 2), corroborando com os dados de CCD e confirmando a presença deste composto nos extratos plasmodiais de *Physarella oblonga*. Os demais metabólitos contidos no extrato bruto, bem como as frações A e B não foram detectadas por CLAE, mesmo após 78 min de eluição, provavelmente, por não terem sido eluídas pelo sistema de solventes utilizado e nem detectadas pelo comprimento de onda empregado neste teste.

Dentre os grupos químicos pesquisados, foi possível detectar a presença do esteroide β -sitosterol no extrato bruto de *Physarella oblonga*, concordando com os dados de CCD que mostraram a correspondência da banda de Rf 47 com o padrão de β -sitosterol aplicado como referência (Figura 1), o que confirma a produção deste metabólito por *Physarella oblonga*. Embora o teste para polifenóis tenha detectado esta classe de compostos no extrato bruto e revelado a fração B como pertencente a essa classe, os mesmos não apresentaram correspondência com o flavonoide quercetina aplicado como referência, o qual não foi eluído pelo sistema eluente utilizado (Figura 3).

A análise do extrato bruto por CLAE, revelou três picos de absorção, com tempos de retenção (Tr) de 2,94 min, 5,98 min e 8,31 min. O primeiro corresponde ao Tr do metanol, sendo, portanto, detectadas apenas dois metabólitos, um com Tr=5,98 e outro com Tr=8,31, o qual coincidiu com o Tr do padrão antraquinona aplicado como referência (Figura 2), corroborando com os dados de CCD e confirmando a presença deste composto nos extratos plasmodiais de *Physarella oblonga*. Os demais metabólitos contidos no extrato bruto, bem como as frações A e B não foram detectadas por CLAE, mesmo após 78 min de eluição, provavelmente, por não terem sido eluídas pelo sistema de solventes utilizado e nem detectadas pelo comprimento de onda empregado neste teste.

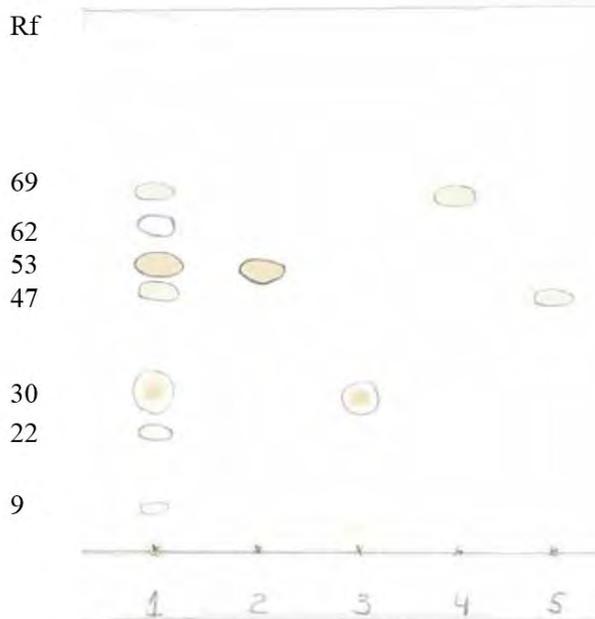


Figura 1. Cromatograma do extrato bruto e das frações isoladas do plasmódio de *Physarella oblonga*. (1) Extrato bruto, (2) Fração isolada com acetato de etila – Fração A, (3) Fração isolada com metanol a 70% - Fração B, (4) Antraquinona e (5) β -sitosterol.

Dentre os grupos químicos pesquisados, foi possível detectar a presença do esteroide β -sitosterol no extrato bruto de *Physarella oblonga*, concordando com os dados de CCD que mostraram a correspondência da banda de Rf 47 com o padrão de β -sitosterol aplicado como referência (Figura 1), o que confirma a produção deste metabólito por *Physarella oblonga*. Embora o teste para polifenóis tenha detectado esta classe de compostos no extrato bruto e revelado a fração B como pertencente a essa classe, os mesmos não apresentaram correspondência com o flavonoide quercetina aplicado como referência, o qual não foi eluído pelo sistema eluente utilizado (Figura 3).

A banda isolada na fração A não apresentou correspondência com nenhum dos grupos químicos pesquisados, não sendo possível atribuir a natureza química deste metabólito. Por outro lado, a banda isolada na fração B apresentou correspondência com a classe de polifenóis, como já citado anteriormente, sugerindo sua inclusão nesta classe de compostos.

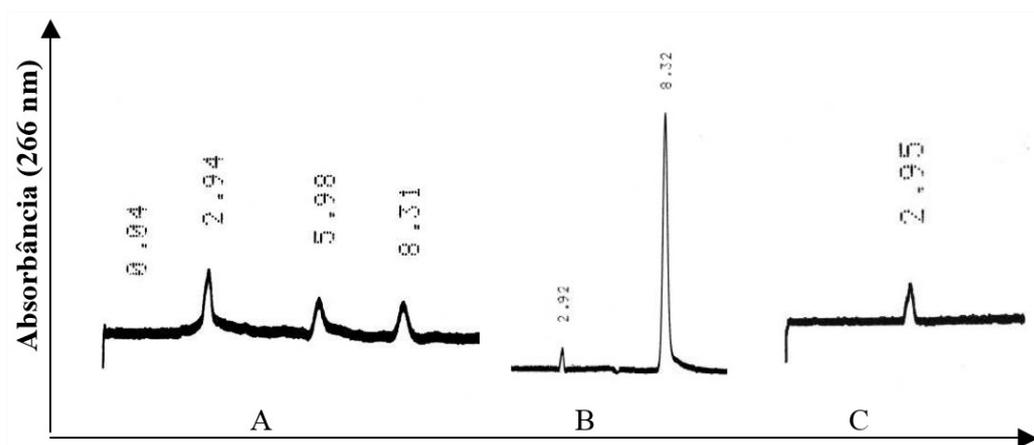


Figura 2. Cromatograma em CLAE do extrato bruto (A) obtido a partir do plasmódio de *Physarella oblonga*, (B) Antraquinona e (C) Tempo de retenção do metanol.



Figura 3. Cromatograma revelado para detecção de polifenóis: extrato plasmodial de *Physarella oblonga* (1), fração B, isolada com metanol a 70% (2) e Quercetina (3). A coloração da fração B indica a classe de polifenóis.

Tempo de retenção (min.)

Estes dados se aproximam aos que já foram referidos para *Physarella oblonga*, como os compostos fenólicos citados por Nair e Zabka (1966). A antraquinona também já foi referida para esta espécie por Ribeiro *et al.* (2002), sendo comprovada no presente trabalho, tanto pelos dados de cromatografia em camada delgada (CCD) como líquida de alta eficiência (CLAE). Os compostos esteroides já foram citados para algumas espécies de mixomicetos, inclusive *Physarella oblonga*, para a qual foi referenciado o esteroide stigmaterol (Herrera *et al.*, 2011). Esta, porém, é a primeira referência de β -sitosterol para a espécie aqui estudada.

Os testes antimicrobianos mostraram o potencial antibiótico tanto do extrato bruto como das frações isoladas, sendo a fração B a de maior potencial inibitório (Tabela 2). Todos os microrganismos testados apresentaram susceptibilidade, com exceção de *E. coli* que se mostrou resistente a todas as amostras de *Physarella oblonga*. Embora a inibição tenha sido evidente em ambas as concentrações, foi notadamente, mais ativa a 2 mg/mL, principalmente frente a *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. phlei*; por outro lado *P. aeruginosa* apresentou pouca sensibilidade às amostras testadas, não se observando diferenças significativas com o aumento da concentração (Tabela 2). Estes dados estão de acordo com vários trabalhos que relatam maior resistência de bactérias Gram-negativas.

As duas espécies de leveduras mostraram-se extremamente sensíveis às substâncias produzidas pelo plasmódio de *Physarella oblonga* nas duas concentrações empregadas (Tabela 2). Isto confirma a acentuada sensibilidade das espécies de *Candida* às substâncias produzidas por mixomicetos, como já evidenciado nos trabalhos desenvolvidos por Guimarães *et al.* (1989), Albuquerque (1998), Chiappeta (1999) e Huynh *et al.* (2017).

Estes resultados demonstram que o potencial antimicrobiano de *Physarella oblonga* está relacionado principalmente a produção de polifenóis, uma vez que a fração B apresentou maior ação inibitória. Embora as substâncias correspondentes à antraquinona e ao esteroide (β -sitosterol) não tenham sido isoladas, é provável que contribuam para a ação antimicrobiana do extrato plasmodial bruto de *Physarella oblonga*, visto que autores como Locquin e Prévot (1948) e Chiappeta (1999), sugerem estes compostos como agentes antimicrobianos encontrados em outras espécies de mixomicetos.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do extrato bruto e de frações isoladas do mixomiceto *Physarella oblonga*.

Microrganismos	Halos de inibição (mm)						ATM
	E _B		F _A		F _B		
	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	
<i>Bacillus subtilis</i>	12	17	12	16	14	18	40*
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	22	18	22	19	25	20*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	11	11	13	12	13	15*
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	41*
<i>Mycobacterium phlei</i>	13	17	12	15	15	18	30**
<i>Candida albicans</i>	20	23	18	19	22	26	25***
<i>Candida tropicalis</i>	22	23	20	20	24	29	27***

E_B – Extrato bruto; F_A – Fração isolada com acetato de etila; F_B – Fração isolada com metanol a 70%; ATM – antimicrobiano; *Cefalotina (30 µg); **Amicacina (30 µg); ***Anfotericina B (100 µg).

4. Conclusão

Physarella oblonga é um mixomiceto com potencial para produzir metabólitos antimicrobianos como Antraquinona, β -sitosterol e polifenóis, que apresentam amplo espectro de ação, uma vez que inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes e fungos leveduriformes.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

5. Referências

- Albuquerque S.S.M. 1998. Atividade antimicrobiana dos extratos de etálios de *Lycogala epidendrum* (Myxomycetes). Tese de Doutorado em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. 181p.
- Araújo E. L. 2002. Aroeira da Praia - Estudo Farmacognóstico e da atividade biológica de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 110p.
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Truck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.
- Chiappeta A.A. 1999. Valor taxonômico do caráter cor do etálio de *Fuligo septica* (Myxomycetes) e sua relação com fatores intrínsecos e extrínsecos. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. 148p.
- Chiappeta A. A., Sena K. X., Rocha C. S., Cavalcanti L. H. 1999. Efeito do tempo de difusão no teste de atividade antimicrobiana de *Fuligo septica* (Myxomycetes). *Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas*, 3: 53-60.
- Costa A.A. 2017. Investigação da atividade biológica de metabólitos produzidos por Myxomycetes da família Reticulariaceae. Tese de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 130p.
- Guimarães L. L., Cavalcanti L. H., Pereira E. C. 1989. Atividade antimicrobiana dos extratos dos corpos frutíferos de *Tubifera Bombarda* (Myxomycetes). *Biologica Brasílica*, 1: 69-77.
- Hashimoto T., Akazawa K., Tori M., Kan Y., Kusumi T., Takahashi H., Asakawa Y. 1994. Three novel polyacetylene triglycerides, lycogarides A-C, from the *Lycogala epidendrum* (Myxomycetes). *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 42:1531-1533.
- Herrera N. A., Rojas C., Franco-Molano A.E., Stephenson S. L., Echeverri F. 2011. *Physarella oblonga*-centered bioassays for testing the biological activity of myxomycetes. *Mycosphere*, 2: 637-644.
- Huynh T., Phung T., Stephenson S. L., Tran H. 2017. Biological activities and chemical compositions of slime tracks and crude exopolysaccharides isolated from plasmodia of *Physarum polycephalum* and *Physarella oblonga*. *BMC Biotechnology*, 17: 76-85.
- Legaz M.E., Vicente C. 1983. Endogenous inactivators of arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase en *Evernia prusnastri* thallus. *Journal of Plant Physiology*, 71, 300-302.
- Locquin M., Prévot A.R. 1948. Études quelques antibiotiques produits par les Myxomycetes. *Annales de L'Institut Pasteur*, 75: 8-13.
- Murray P, Rosenthal, K.S., Pfaller M. 2016. *Medical microbiology*. Ed. Elsevier, 8ª edição.
- Nair P., Zabka G. 1966. Pigmentation and sporulation in selected Myxomycetes. *American Journal of Botany*, 53: 887-892.
- Pereira E.C., Molina M.C., Pedrosa M. M., Solas M. T., Vicente C., Legaz M. E. 1995. Production of ribitol by alginate-immobilized cells of the lichen *Cladonia verticillaris*. *Anales de Química*, 91: 253-259.
- Ribeiro S. M., Cavalcanti L. H., Gusmão N. B., Pereira E. C., Silva N. H. 2002. Detecção de atividade antibacteriana *in vitro* nos extratos brutos obtidos a partir do plasmódio de *Physarella oblonga* (Berk. & Curt.) Morgan (Myxomycetes). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12: 100-102.
- Ribeiro S. M., Cavalcanti L. H., Pereira E. C., Silva N. H. 2003. Production of substances by kaolinite-immobilized plasmodium of *Physarella oblonga* (Berk. & Curt.) Morgan (Myxomycetes). *Research in Mycobiology*, 154: 55-58.
- Sobels J. 1950. Nutrition de quelques Myxomycetes en cultures pures et associées et leurs propriétés antibiotiques. Article in *Antonie van Leeuwenhoek*, 16(1):123-124.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. *Microbiologia*. ARTMED, 12ª ed.
- Wagner H., Bladt S. 1996. *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, 2ª ed. 384p.
- Wang Q., Li W., Liu P. 2017. *Physiology and Biochemistry of Myxomycetes*. Chapter 6. Myxomycetes: Biology, Systematics, Biogeography and Ecology. Edited by Carlos Rojas Alvarado, Steven L. Stephenson.

Formação de Recursos Humanos em Micologia na Pós-Graduação do Sul do Brasil

DRECHSLER-SANTOS, Elisandro Ricardo¹; MONTEIRO, Marcela¹; RIBEIRO-NARDES, Wesley¹; COSTA-REZENDE, Diogo Henrique^{1,2}

¹PG em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina

²PG em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais

Emails: e.ricardo@ufsc.br, monteiro-marcela@hotmail.com, wesllynardes@gmail.com, diogobio.dh@gmail.com.

Resumo

Os Recursos Humanos formados em Micologia ou áreas afins ao estudo dos fungos ainda são poucos no Brasil. Com objetivo de entender o quanto a região Sul contribui tradicionalmente para formação na Pós-Graduação do país foram realizadas consultas ao catálogo de teses e dissertações da CAPES em dois períodos (anterior e posterior à 2010). A pesquisa foi realizada no âmbito do colégio de Ciências da Vida, onde estão os Programas de Pós-Graduação avaliados pelas distintas áreas das Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde. Em um primeiro momento somente Trabalhos de Conclusão de Cursos (TCCs: teses/dissertações) de PPGs acadêmicos foram consultados e quase 6 mil trabalhos do território nacional foram encontrados citando a palavra “Fungos” no título, resumo ou palavras-chave, só de 2010 pra cá. Destes, mais de 20% são de TCCs desenvolvidas em PPGs da região Sul do Brasil. Outros termos de grupos taxonômicos e funcionais e genéricos foram consultados e os resultados são apresentados. A grande maioria dos TCCs não utilizam os fungos como objeto principal de estudo, ou seja, utilizam como modelos para trabalhos bioquímicos, expressão gênica, atividades microbianas, entre outros. A produção relacionada a micologia é menor nos mestrados profissionais que nos acadêmicos. O volume de TCCs e formação de RH no país, em alguns casos, pode ser cinco vezes maior a partir de 2010 quando comparado com o período anterior à 2010. Por fim, uma visão geral sobre a micologia ambiental nos PPGs da área de Biodiversidade do Sul do Brasil é apresentada.

Palavras-chave: Micologistas, Micólogos, Mestres, Doutores, Fungos.

1. Introdução

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a fundação do Ministério da Educação (MEC) tem por missão a expansão e consolidação da pós-graduação em todo o território brasileiro (CAPES, 2019). O gigantesco Colégio de Ciências da Vida da CAPES, onde estão as Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, reúne mais de 1370 Programas de Pós-Graduação (PPGs). Mesmo assim, os Recursos Humanos (RH) formados com especialidade na área da Micologia ou áreas afins ao estudo dos fungos ainda são poucos no Brasil (Maia 2003, 2015; Peixoto *et al.*, 2006).

A formação de recursos humanos em nível de pós-graduação tem grande relevância na abordagem e geração de conhecimento acerca de temas importantes como o reconhecimento da biodiversidade (Borges, 2008). Quando se trata de biodiversidade sabe-se que os organismos do Reino Fungi estão entre os mais inexplorados do planeta, visto que de acordo com estimativas menos de 7% das espécies do grupo são conhecidas (Blackwell, 2011; Hawksworth e Lucking, 2017). Por outro lado, os fungos são bastante reconhecidos quanto a sua importância ecológica na ciclagem de nutrientes, importância científica em áreas como fisiologia e medicina, sendo que desde 2010 mais de um quarto dos prêmios Nobel nessas áreas foram para trabalhos envolvendo leveduras, e industrial, visto que 60% das enzimas utilizadas em processos industriais são oriundas de fungos (Webster e Weber, 2007; Watkinson *et al.*, 2015; Willis, 2018).

Historicamente a formação e desenvolvimento inicial da micologia brasileira teve contribuição fundamental dos europeus em suas viagens à América do Sul, e posteriormente a participação dos próprios brasileiros (Reitz, 1949; Fidalgo, 1968; Loguercio-Leite, 1990). Dada a importância dos PPGs na formação de RH especialistas

em micologia, bem como da geração de conhecimento e o potencial de descobertas para organismos do Reino Fungi, estudos que tratem dos indicadores de produção relacionados a micologia (trabalhos de conclusão de curso) das Pós-graduações são importantes para o entendimento da evolução e distribuição desse conhecimento no Brasil. Nesse contexto, com objetivo de entender o quanto a região Sul vem tradicionalmente contribuindo para formação na Pós-Graduação do país foram realizadas consultas ao Catálogo de Teses e Dissertações da CAPES. O cenário resultante desta investigação é aqui apresentando e comentado.

2. Material e Métodos

A pesquisa foi realizada no âmbito do colégio de Ciências da Vida, onde estão os PPGs avaliados pelas distintas áreas das Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde. Através do Catálogo CAPES (CAPES, 2019) foram consultados Trabalhos de Conclusão de Cursos (TCCs: teses/dissertações) de PPGs acadêmicos e de Mestrados Profissionais de todo o País e especificamente daqueles da região Sul. Foram utilizadas terminologias específicas da Micologia, como “Fungos”, “Fungi” e “Micologia”. Outros termos de agrupamentos taxonômicos, funcionais e genéricos também foram consultados. Os resultados foram separados em dois períodos, dos registros das décadas de 80 e 90 até 2009 (incluindo dados de 2009) e a partir de 2010, incluindo dados deste ano até o presente, cujos dados registrados eram de até 2018. A referida pesquisa foi realizada em maio de 2019.

Por fim, uma visão geral sobre a micologia ambiental no âmbito dos PPGs da área de Biodiversidade do Sul do Brasil é apresentada e comentada.

3. Resultados e Discussão

3.1. Mestrados e Doutorados Acadêmicos

A partir de 2010 foram produzidas quase 6 mil dissertações/teses (somente acadêmicos) em que tiveram o termo “Fungos” sendo citado no título, resumo ou palavras-chave. Destes, mais de 20% (>1200) são de TCCs (maior proporção de dissertações) desenvolvidas em PPGs da região Sul do Brasil (Fig. 1).

Ao utilizar o termo “Fungi”, ou seja, a categoria mais alta no sistema de classificação que enquadra taxonomicamente a linhagem dos fungos (Webster e Weber, 2007; Watkinson *et al.*, 2015), um pouco mais de 3 mil registros são contabilizados. Destes, 22% são de dissertações (maior proporção) e de teses produzidas nos PPGs da região Sul. Ainda, um pouco mais de 50 dissertações/teses (somente acadêmicos) tiveram o termo “Micologia” sendo citado e apenas 12% destas são da região Sul.

À medida que se utilizam termos mais restritos à área de estudo dos fungos os registros diminuem consideravelmente, demonstrando que a grande maioria dos TCCs não utilizam os fungos como objeto principal de estudo, mas principalmente como modelos para trabalhos bioquímicos, de expressão gênica, de atividades microbianas, entre outros. Desta forma, é sabido que nem todos os Mestres/Doutores dessas dissertações/teses obtiveram sua especialidade em Micologia. No entanto, os fungos, por sua vez, estão envolvidos em uma grande quantidade de TCCs e demonstram alto potencial para pesquisa e formação de RH. Tal resultado era esperado dado o leque de aplicação dos fungos, especialmente na indústria (Esser e Bennett, 2002; Willis, 2018).

Fica mais claro ainda esse potencial, quando são comparados os períodos de produção de TCCs, onde é possível observar que nos últimos anos o número de TCCs é considerado muito maior (Fig. 2). Vale ressaltar que no mesmo período houve um crescimento geral no número de PPGs e conseqüentemente no número de TCCs no Brasil (Cirani *et al.*, 2015), o que pode indicar que esse aumento dos TCCs relacionados a micologia tem influência externa ao aumento do interesse nos fungos.

Quando as palavras chave para a busca são os termos referentes aos grandes grupos taxonômicos tradicionais do Reino Fungi (Alexopoulos *et al.* 1996), o total de trabalhos (Fig. 3) é ainda menor do que comparado com o termo “Fungi”, apontando mais uma vez que boa parte dos trabalhos não utilizam os fungos como principal objeto de estudo. Basidiomycota e Ascomycota foram os dois termos mais abundantes em citações, sendo que mais uma vez aproximadamente 20% das citações são oriundas de TCCs realizados na região Sul.

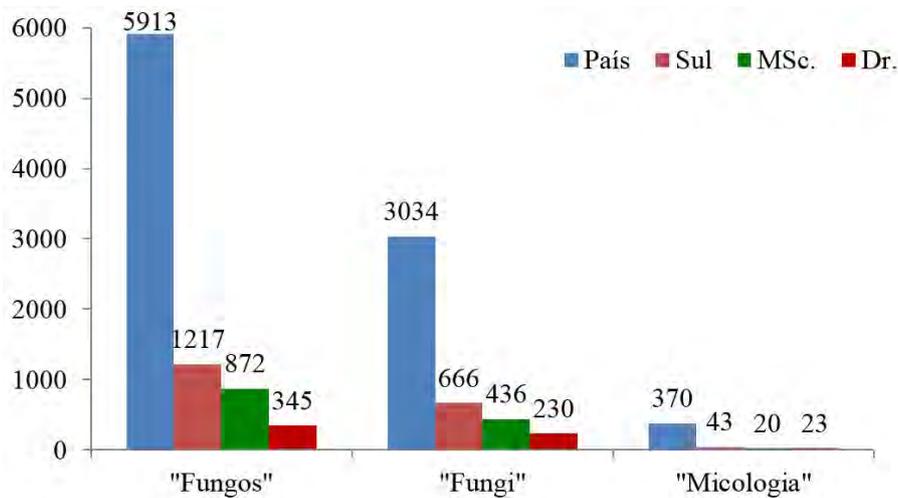


Figura 1. Número de teses/dissertações com termos "Fungos", "Fungi" e "Micologia" produzidos a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

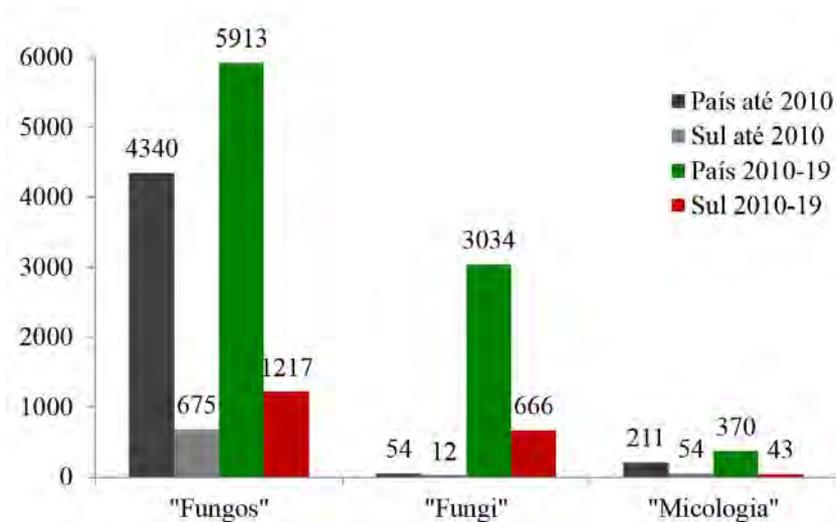


Figura 2. Número de teses/dissertações com termos "Fungos", "Fungi" e "Micologia" produzidos até e a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

É importante salientar aqui que alguns dos filos pesquisados são aparentemente subamostrados, dado o baixo número de trabalhos produzidos, como no caso dos grupos Glomeromycota, Zygomycota e Chytridiomycota. Mais marcante ainda é o fato de que nenhum trabalho realizado no sul do Brasil desde 2010 apresenta as palavras Zygomycota e Chytridiomycota. Essa observação se apoia no fato de que o conhecimento acerca de determinado grupo de fungos está diretamente relacionado com o número de micólogos especialistas no grupo em questão (Blackwell, 2011; Hawksworth e Lucking, 2017). Ainda, mais uma vez observa-se o grande crescimento da produção a partir de 2010 (Fig. 4).

A utilização de palavras chave relacionadas a características funcionais dos fungos (Fig. 5), ou seja, a "função" desses organismos nos ecossistemas, demonstra que com exceção do termo "entomopatógenos", a contribuição da região Sul na produção de TCCs foi mais uma vez próxima a 20% da produção total. Os fungos "fitopatógenos" foram o grupo funcional mais citado na produção tanto da região Sul como do Brasil como um todo. Esses organismos caracterizados por serem patógenos de plantas. A abundância de registros desse grupo pode estar relacionada com o fato de que esses organismos podem causar grandes prejuízos econômicos, sendo por isso amplamente estudados (Savary *et al.*, 2012; Freire, 2015).

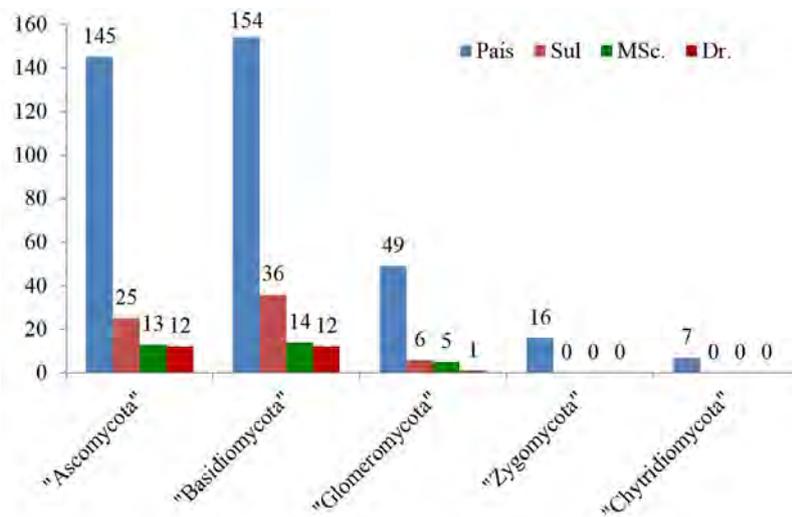


Figura 3. Número de teses/dissertações com termos dos grandes grupos taxonômicos (filos) tradicionalmente reconhecidos no Reino Fungi produzidos a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

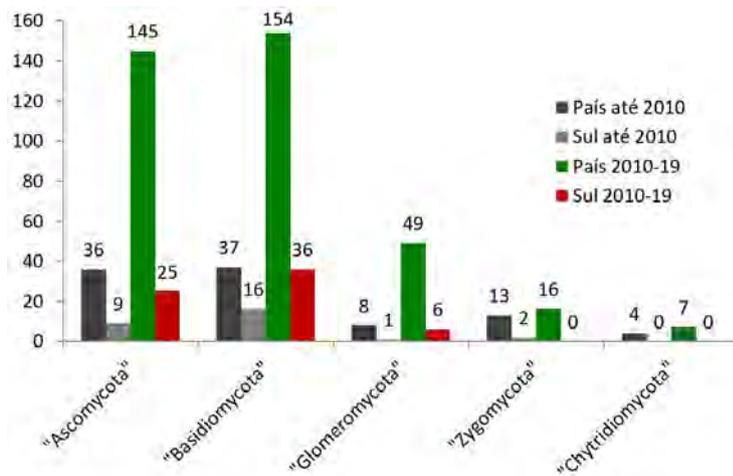


Figura 4. Número de teses/dissertações com termos dos grandes grupos taxonômicos (filos) tradicionalmente reconhecidos no Reino Fungi produzidos até e a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

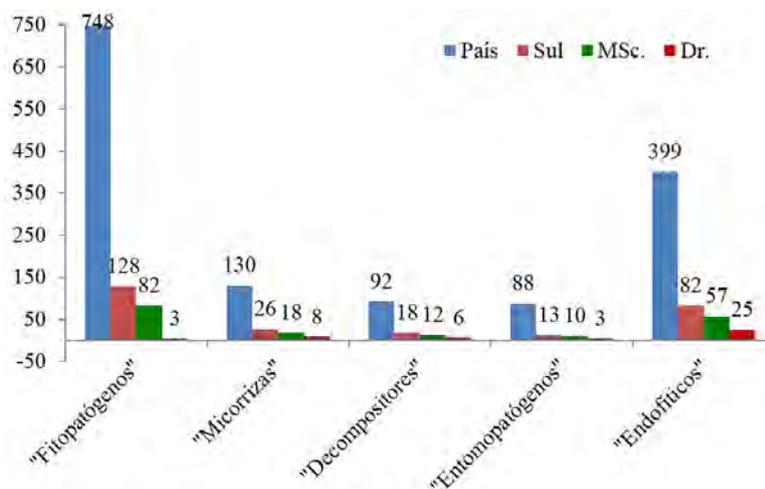


Figura 5. Número de teses/dissertações com termos dos grandes grupos funcionais de fungos produzidos a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

Por outro lado, grupos com reconhecida importância ecológica foram menos citados, como as “micorrizas” e “decompositores”, indicando que os trabalhos com viés aplicado predominam em relação a trabalhos ecológicos. Mais uma vez, quando comparamos os números de teses/dissertações com termos dos grandes funcionais de fungos produzidos até e a partir de 2010 no Brasil, bem como representatividade dos PPGs da região Sul, percebemos a partir de 2010 houve um aumento considerável quando utilizados alguns dos termos (Fig. 6).

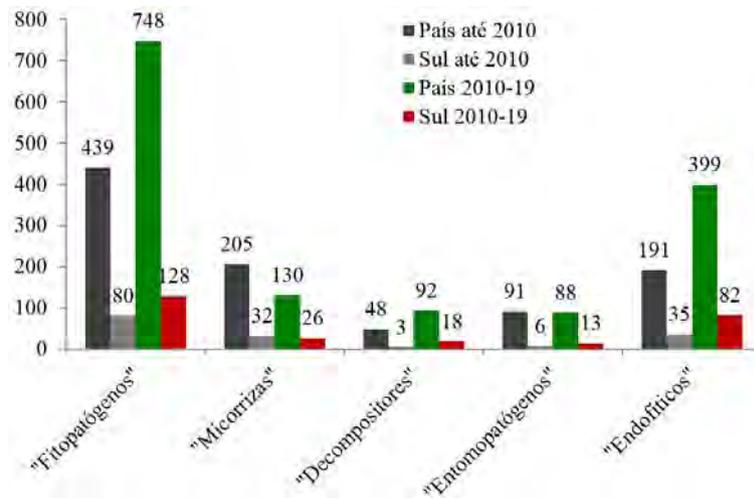


Figura 6. Número de teses/dissertações com termos dos grandes grupos funcionais de fungos produzidos até e a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

Ao se utilizar termos genéricos como palavras chave (micose, mofo, bolor, macrofungos e microfungos) nota-se que os termos mais citados foram micose e mofo (Fig. 7). É sabido que tribos indígenas residentes em território brasileiro são micofílicas (Cardoso *et al.*, 2010), no entanto não existe um estudo sobre a população geral, sendo assim, mais estudos (etnomicologia) seriam necessários para testar se esse resultado está relacionado ao fato de que essas palavras são as mais conhecidas popularmente, ou se a maior utilização de termos com conotação negativa (doenças ou destruição de materiais de interesse do ser humano) estão relacionadas a uma percepção negativa da sociedade em relação aos fungos.

Quanto a representatividade da região Sul levando em consideração essas palavras chave, merece destaque que cerca de 40% das citações do termo “macrofungos” são oriundas da região Sul, o que pode ser reflexo da presença de programas de Pós-graduação comprometidos com a formação de especialistas em micologia. Adicionalmente, mais uma vez nota-se o grande incremento na produção a partir de 2010 (Fig. 8).

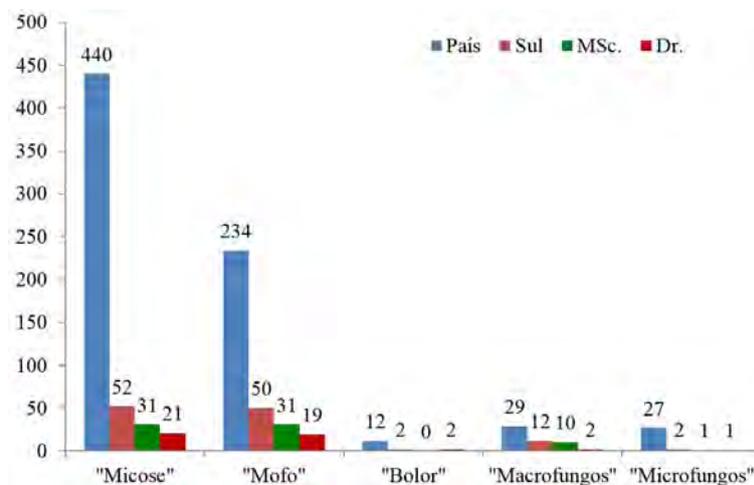


Figura 7. Número de teses/dissertações com termos de agrupamento genéricos de fungos produzidos a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

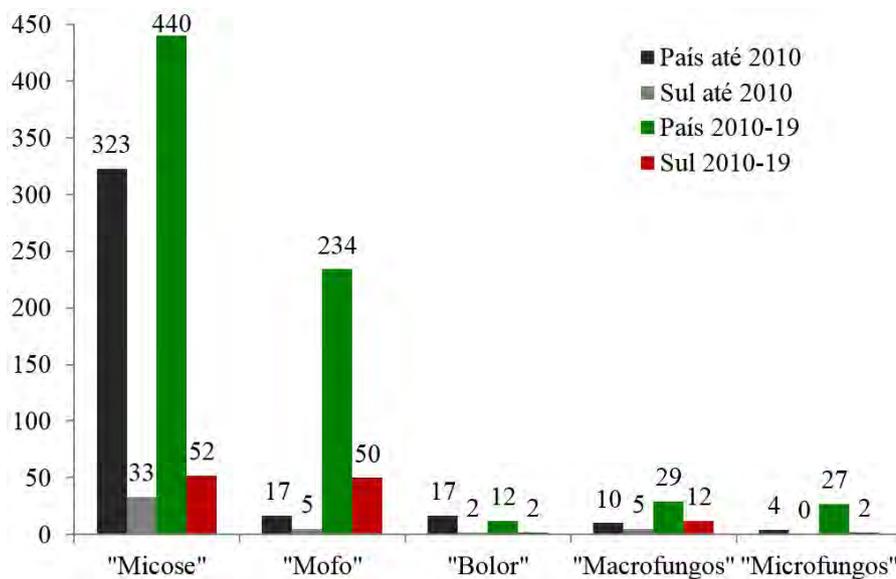


Figura 8. Número de teses/dissertações com termos de agrupamento genéricos de fungos produzidos até e a partir de 2010 no Brasil e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul.

3.2. Mestrados Profissionais

Quanto aos mestrados profissionais observa-se que o número de citações de termos relacionados a micologia é inferior ao número de citações nos mestrados acadêmicos nas três palavras chave utilizadas na pesquisa (Fig. 9). Além disso, a contribuição relativa da região Sul nesse segmento também é menor do que nos mestrados acadêmicos (Fig. 9). Uma vez que muitos dos mestrados profissionais em biologia são voltados para a formação de professores é de fundamental importância fomentar o estudo dos fungos nesse âmbito, pois essa seria uma importante estratégia para contribuir com a difusão do conhecimento e popularização desses organismos pela sociedade (PROFBIO, 2019).

3.3. A Região Sul e a Micologia Ambiental

Especificamente na área da Biodiversidade/CAPES existem 24 PPGs em funcionamento na região Sul e a grande maioria está voltada para as Áreas Básicas Zoologia e Ecologia, existindo apenas três da Botânica, onde, de modo geral, pesquisadores da diversidade em Micologia estão tradicionalmente inseridos (Fig. 10). No entanto, atualmente, nem todos apresentam Micólogos credenciados realizando pesquisas e formando RH em Micologia.

Neste contexto, os PPGs em Botânica da UFRGS (PPGBOT - Universidade Federal do Rio Grande do Sul), da UFPR (PPGBOT - Universidade Federal do Paraná) e em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina) formaram ou ainda vêm formando especialistas na área da Micologia. Ainda, em 2019, foi recomendado pela CAPES o PPG em Biodiversidade da FURB (Universidade Regional de Blumenau) que também se propõe, em uma de suas linhas de pesquisa, à formação em Micologia.

Destes, o PPG em Botânica da UFRGS é o mais antigo, foi criado em 1969. Dos seus cursos de Mestrado e de Doutorado já foram formados mais de 350 profissionais, sendo a maioria dos Mestres (250 dissertações). Atualmente, dentre os 25 docentes (PPGBOT/UFRGS, 2019) está a Dra. Rosa Mara da Silveira, micóloga dedicada ao ensino, pesquisa e formação de RH. Também, neste PPG, há o histórico da atuação de outras duas grandes especialistas, as Dras. Maria Henriqueta Homrich e Rosa Trinidad Gerreiro, que participaram da formação de mais de 20 Mestres (uma dissertação em andamento) e 22 Doutores (cinco teses em andamento) do Programa (Fig. 11).

Em relação ao PPG em Botânica da UFPR, foi fundado em 1979 e se dedica a formar RH com seu curso de Mestrado (PPGBOT/UFPR, 2019). O histórico da atuação de especialistas na área da micologia se dá a partir de dois especialistas, a Dra. Sionara Eliasaro e o Dr. Vagner Gulart Cortez, os quais totalizam orientação em 27 dissertações concluídas (Fig. 11). Infelizmente, atualmente não há micólogos credenciados no PPG do Paraná.

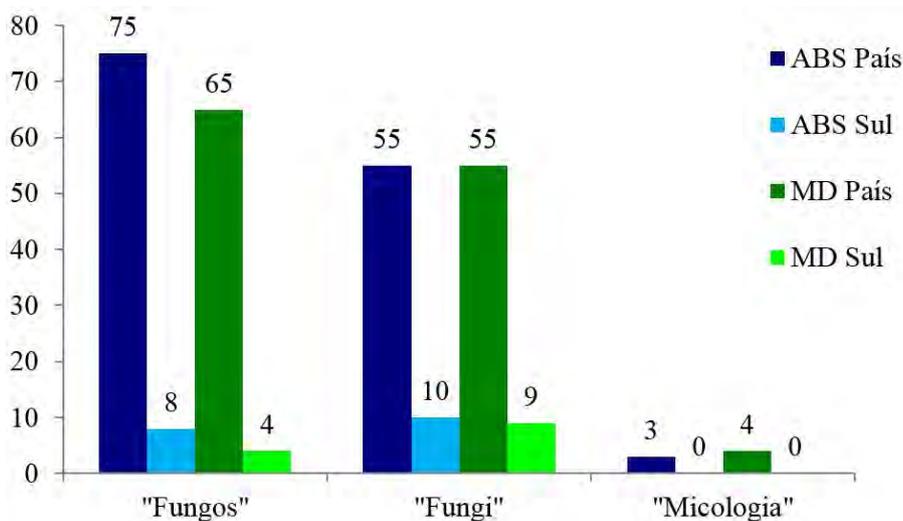
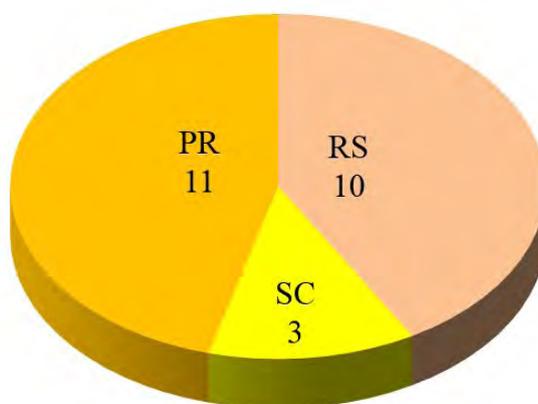


Figura 9. Número de dissertações de cursos de Mestrado Profissional das áreas do Colégio de Ciências Biológicas (agrárias, biológicas e saúde) e da área Multidisciplinar (MD) da CAPES com termos "Fungos", "Fungi" e "Micologia" produzidos no Brasil a partir de 2013 e representatividade dos Programas de Pós-Graduação da região Sul..



24 PPGs Sul do Brasil

Figura 10. Número de Programas de Pós-Graduação da região Sul da área de Biodiversidade da CAPES, com respectivo número por Estado.

Por fim, o atual PPGFAP/UFSC (ex Biologia Vegetal) em 1999, formando mais de 200 Mestres. Neste contexto, a Profª. Dra. Clarice Loguercio-Leite foi quem iniciou os estudos e formação em Micologia no Programa. A partir de 2010, além de uma profunda transformação no PPG, que culminou inclusive na mudança do nome do PPG e definição da área de concentração "Biologia de Fungos, Algas e Plantas", foi criado o curso de doutorado em 2017. Atualmente, atuam no ensino, pesquisa e formação de RH no PPG a Dra. Maria Alice Neves e o Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos, que juntos com a grande contribuição dada pela Dra. Clarice, totalizam orientação de 42 dissertações (34 mestres) e cinco teses de doutorado em Micologia no Programa (Fig. 11), bem como outras 14 (cinco em andamento) teses em outros PPGs.

De modo geral, a grande maioria destes mais de 100 profissionais formados nestes PPGs do Sul do Brasil (da área de Biodiversidade da CAPES) estão exercendo a micologia como professores de ensino básico ou superior público/privado e/ou como pesquisadores, alguns doutorandos ou pós-doutorandos ou na iniciativa privada. Também há profissionais autônomos ou atuando em empresas/indústrias para fornecimento de bens ou serviços através dos fungos para a sociedade.

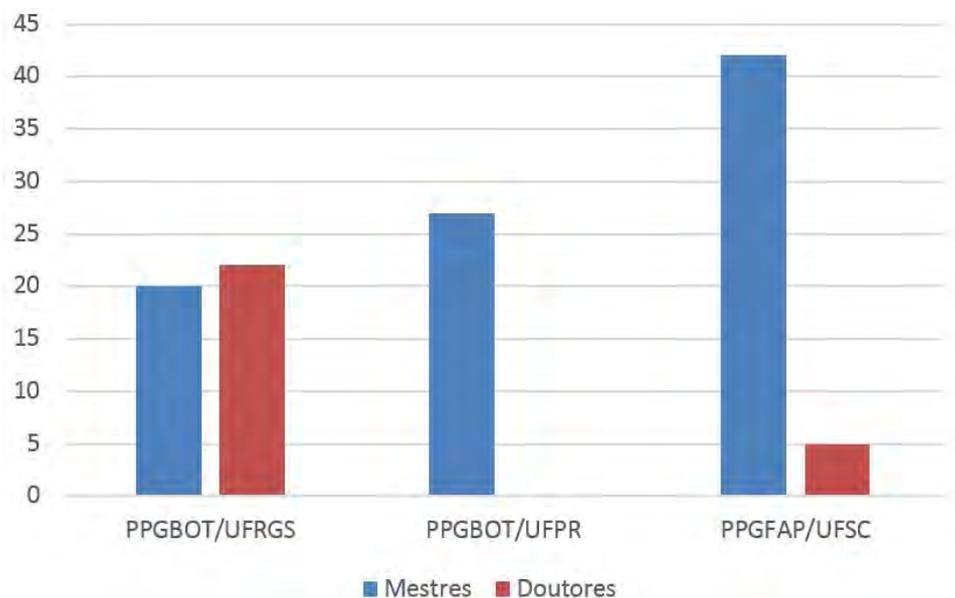


Figura 11. Número de teses/dissertações dos Programas de Pós-Graduação da região Sul relacionados à Botânica da Biodiversidade, área de avaliação da CAPES.

4. Conclusões

Os Programas de Pós-Graduação acadêmicos da região Sul contribuem com cerca de 20% da produção nacional de teses/dissertações que envolvem organismos do Reino Fungi.

A maior parte dessa produção não é especializada em micologia e os Mestrados Profissionais carecem de mais estudos envolvendo fungos, o que seria fundamental para uma potencial disseminação do conhecimento sobre esses organismos em todas as esferas da sociedade.

Agradecimentos

Aos especilistas, Dra. Clarice Loguercio-Leite, Dra. Leonor Costa Maia, Dra. Rosa Mara da Silveira e Dr. Vagner Gulart Cortez, pelas contribuições com o trabalho. Ao PPGFAP/UFSC e CNPq (Universal n°: 421966/2016-5 e PQ n°: 311158/2018-8) pelo apoio. Esse é um trabalho parte do projeto MIND.Funga: <http://www.mindfunga.ufsc.br/>.

5. Referências

- Alexopoulos C. J., Mims C. W., Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley, New York. 870p.
- Blackwell M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98:426–438.
- Borges S. H. 2008. A importância do ensino de pós-graduação na formação de recursos humanos para o estudo da biodiversidade no Brasil: um estudo de caso na ornitologia. *Biota Neotropica*, 8(1):21-27.
- CAPES 2019. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [on line]. Brasil, Disponível em: <<https://www.capes.gov.br/pt/historia-e-missao>>. Acesso em: 17 jul. 2019.
- CAPES 2019a. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [on line]. Brasil, Disponível em: <<https://capes.gov.br/pt/avaliacao/sobre-as-areas-de-avaliacao>>. Acesso em: 17 jul. 2019.
- CAPES 2019b. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [on line]. Brasil, Disponível em: <<https://catalogodeteses.capes.gov.br/catalogo-teses/#/>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

- Cardoso D. B., de Queiroz L. P., Bandeira F. P., Góes-Neto A. 2010. Correlations between indigenous brazilian folk classifications of fungi and their systematics. *Journal of Ethnobiology*, 30(2):252-265.
- Cirani C. B. S., de Abreu Campanario M., Silva H. H. M. 2015. A evolução do ensino da pós-graduação senso estrito no Brasil: análise exploratória e proposições para pesquisa. *Avaliação-Revista da Avaliação da Educação Superior*, 20(1).
- Esser K.; Bennett J. W. 2002. (Ed.). *The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. 10. ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. 388p.
- Freire F. das C.O. (015. A Introdução de Fitopatógenos e Doenças Emergentes na Agricultura Cearense. Ciências Agrárias/ Fitotecnia. *Essentia*, Sobral, 16(2):22-39. on line]. Disponível <<http://www.uvanet.br/essentia/index.php/revistaessentia/article/view/33/45>>. Acesso em: 17 de julho 2019.
- Hawksworth, D.L., Lucking, R. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4):1-17.
- Loguercio-Leite C. 1990. Revisão histórica sobre fungos poliporóides (Aphyllophorales) xilófilos de Santa Catarina, Brasil. *INSULA Revista de Botânica*, 20:03-10.
- Maia L.C. 2003. Coleções de fungos nos herbários brasileiros. In: A.L. Peixoto & L.C. Maia (Org.) Coleções Biológicas de apoio ao inventário, uso sustentável e conservação da biodiversidade. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Maia L.C. *et al.* 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* 66(4):1033-1045. DOI: 10.1590/2175-7860201566407.
- Peixoto A.L.; Barbosa M.R.V.; Menezes M.; Maia L.C. 2006. Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções botânicas brasileiras com base na formação de taxonomistas e na consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. Pg:145-182. In: Adriano B. Kury *et al.* Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos/Ministério da Ciência e Tecnologia.
- PPGUFPR 2019. Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná [on line]. Brasil, Disponível em: <<http://www.ppgbotanica.ufpr.br/>>. Acesso em: 17 jul. 2019.
- PPGUFGRS 2019. Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul [on line]. Brasil, Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/ppgbotanica/historico-do-programa/historico>>. Acesso em: 17 jul. 2019.
- PROFBIO 2019. Mestrado Profissional em Ensino de Biologia [on line]. Brasil, Disponível em: <<https://www.profbio.ufmg.br/apresentacao/>>. Acesso em: 17 jul. 2019.
- Reitz R. 1949. História da botânica catarinense. *Sellowia*, 1:23-110.
- Savary S., Ficke A., Aubertot J., Hollier C. 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4):519-537.
- Watkinson S. C., Boddy L., Money N. P., Carlile M. J. 2016. *The fungi*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press. 466p.
- Webster J., Weber R. 2007. *Introduction to Fungi*. Cambridge: Cambridge University Press. 875p.
- Willis K. J. (ed.) 2018. *State of the World's Fungi 2018*. Report. Royal Botanic Gardens, Kew. 92p.

Macromicetos Amazônicos: potenciais biotecnológicos de modo sustentável

SALES-CAMPOS, Ceci¹; CHEVREUIL, Larissa Ramos²

¹ Pesquisadora, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

² Técnica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: ceci@inpa.gov.br, lchevreuil@inpa.gov.br

Resumo

Os cogumelos são amplamente apreciados devido às suas propriedades nutricionais e medicinais. Contudo, o seu consumo ainda é baixo em alguns países, incluindo o Brasil, devido ao seu elevado custo, muitas vezes associado à baixa produção no país. A produção de cogumelos, normalmente, se dá via cultivo axênico utilizando-se resíduos agroindustriais. Contudo, o cultivo líquido tem se mostrado promissor, principalmente quando se objetiva biomoléculas com possível aplicação industrial (enzimas do complexo lignocelulolítico, proteínas e polissacarídeos). Assim, considerando o número limitado de investigações acerca dos cogumelos amazônicos, estudos envolvendo a produção desses fungos em diferentes resíduos lignocelulósicos, assim como a síntese de biomoléculas são essenciais do ponto de vista de conhecimento de espécies novas e de suas potencialidades, contribuindo para a preservação deste bioma, assim como para o uso adequado das espécies. A partir de resultados preliminares, obtidos de projetos de pesquisa desenvolvidos no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pode-se inferir que algumas espécies nativas da Amazônia apresentam grande potencial para a produção de enzimas ligninolíticas (lacase, lignina e manganês peroxidases) e de polissacarídeos. Adicionalmente, estudos envolvendo a detecção de proteínas e/ou glicoproteínas ainda estão sendo conduzidos, tanto a partir dos corpos de frutificação, produzidos em cultivo sólido utilizando-se resíduos regionais, como da biomassa micelial e/ou caldo de fermentação submersa. Diante do exposto, linhagens de cogumelos amazônicos apresentam grande potencial para produção em larga escala, visando atender o mercado local de cogumelos. Adicionalmente, desponta para uma importante obtenção de biomoléculas ativas de aplicação industrial.

Palavras-chave: Cogumelo, Enzimas ligninolíticas, Amazônia.

1. Introdução

Os macromicetos, popularmente conhecidos como cogumelos, são reconhecidamente apreciados em todo o mundo devido às suas propriedades nutricionais e medicinais desde os tempos antigos, a datar do período Paleolítico (Shirur e Shivalingegowda, 2015). Há relatos de que os romanos consideravam os cogumelos como “alimentos dos Deuses”, ao passo que os primeiros egípcios os tinham como “um presente do Deus Osíris”. Os chineses, por sua vez, consideravam-nos “o elixir da vida”, sendo estes, os grandes consumidores de cogumelos e conhecedores de suas propriedades nutricionais e medicinais (Smith *et al.*, 2002; Furlani e Godoy, 2005, Sales-Campos, 2008).

Historicamente, os cogumelos têm sido bastante consumidos, principalmente, devido aos benefícios que proporcionam à saúde. Contudo, com o advento dos avanços tecnológicos, só recentemente suas moléculas bioativas têm sido isoladas e caracterizadas, testada as suas bioatividades e, então, confirmada a sua eficiência sobre o tratamento de algumas doenças e/ou outras aplicações biotecnológicas (Smith *et al.*, 2002).

Apesar de sua grande importância para variados fins, seja alimentício e/ou medicinal, o seu consumo ainda é baixo em alguns países, uma vez que em muitos lugares não faz parte da culinária local, ou por falta do conhecimento de suas propriedades, por crença popular quanto à sua natureza venenosa e, principalmente, pelo elevado custo de mercado (Shibata e Demiate, 2003; Bett e Perondi, 2011).

Quanto à produção, o Brasil não é considerado um grande produtor, tampouco consumidor. Contudo, sua grande diversidade de espécies, com ênfase na Amazônia, tem despertado bastante interesse do ponto de vista de prospecção de novas espécies com potenciais inovações alimentares ou suplementos funcionais, bem como de

moléculas com aplicabilidade nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (Elisashvili, 2012; ANPC, 2013; Sales-Campos, 2013).

Deste modo, muitas pesquisas envolvendo cogumelos têm sido direcionadas, inicialmente, ao isolamento de espécies, otimização do processo de cultivo e produção (fermentação submersa e sólida) e, posteriormente, na prospecção de moléculas bioativas com possível aplicação industrial, inserindo-se nesse cenário, enzimas de despolimerização ligninolítica, amplamente aplicadas nas indústrias de biopolpação, xenobióticos e biorremediação (Mielgo *et al.*, 2001; Maciel *et al.*, 2010).

No âmbito da Floresta Amazônica, apesar de sua magnitude em diversidade de espécies, a micobiota ainda é insuficientemente estudada, contudo, algumas espécies de cogumelos têm sido consideradas promissoras para o cultivo e comercialização, entre elas, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus strigosus*, *Polyporus* sp.; *Auricularia* spp., *Lentinula rephanica*, *Panus striguelus* (sinonímia *Lentinus striguelus*), *Favolus brasiliensis* (Sales-Campos, 2008; 2013; Komura, 2016).

Pleurotus corresponde ao gênero com grande número de espécies com maior potencial de cultivo em regiões onde a predominância do clima é quente e úmido, como a região Norte. Isto se deve ao fato de que são cogumelos mais rústicos, de fácil adaptação, manutenção, menor custo de cultivo, além de sua alta eficiência na decomposição de resíduos agroindustriais e/ou madeireiros (Sales-Campos, 2008; Cardoso, 2013). Entretanto, existem muitas espécies de clima frio, exigindo maiores investimentos tecnológicos.

A produção de cogumelos, normalmente, se dá via cultivo tradicional (em toras) e cultivo axênico, nos quais se utilizam substratos formulados a partir de resíduos agroindustriais (resíduos de práticas agrícolas, agroflorestais e madeireiros), sendo que o último requer condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade (Sales-Campos, 2008; Elisashvili, 2012). Contudo, o cultivo líquido (fermentação submersa) tem se mostrado promissor, principalmente quando o objetivo é a obtenção de moléculas bioativas de aplicação industrial, uma vez que necessita de um tempo relativamente curto, menor espaço e redução de contaminações (Trapp *et al.*, 2018). Neste cultivo, normalmente, utilizam-se meios sintéticos e/ou meios alternativos que, em condição de otimização, seguem parâmetros físico-químicos (concentração de carbono, nitrogênio, oxigênio, tempo de fermentação) estritamente definidos, de modo a proporcionar o máximo de produção da molécula ou composto bioativo alvo.

Independente da forma de produção, os cogumelos, de modo geral, têm sido investigados acerca da sua potencialidade em sintetizar um grande arsenal de moléculas de importância farmacológica e biotecnológica, com destaque para as enzimas do complexo lignocelulolítico (celulases e peroxidases), proteínas e/ou glicoproteínas (proteases, inibidores de proteases e lectinas), polissacarídeos (incluindo polissacaropeptídeos e proteoglicanos), além de metabólitos secundários como os compostos fenólicos, ácidos, terpenóides, sesquiterpenos, alcaloides, esteróis, agentes quelantes de íons metálicos e vitaminas (Erjavec *et al.*, 2012; Erjavec *et al.*, 2016).

Nesse sentido, considerando a importância dos cogumelos como uma prática econômica, assim como na obtenção de metabólitos bioativos de importância industrial, torna-se imprescindível a investigação acerca de novos organismos e novas moléculas, dando destaque para a bioprospecção em regiões tropicais, incluindo a Amazônia, onde pouco se conhece quanto ao número de espécies e suas potencialidades, contribuindo, desta maneira, para a preservação deste bioma, assim como para o uso adequado das espécies.

2. Produção de cogumelos

Nos últimos anos, a produção de cogumelos tem aumentado exponencialmente, sendo 30 vezes superior em relação à produção reportada em 1978, passando de 1 bilhão de quilograma para 34 bilhões de quilograma em 2013. Este fato deve-se, principalmente, ao rápido aumento na taxa de consumo de cogumelos *per capita*, especialmente após 1997 (Royse *et al.*, 2017).

Entre os principais produtores e consumidores de cogumelos no mundo, destaca-se a China, sendo responsável por cerca de 87% do total da produção, correspondendo a, aproximadamente, 30 bilhões de quilogramas (ano de 2013), enquanto o restante da Ásia produz cerca de 1,3 bilhões de quilogramas. Estados Unidos e outros países são responsáveis pela produção de 3,1 bilhões de quilogramas (Royse *et al.*, 2017).

No que diz respeito às espécies produzidas, o gênero *Lentinula* é o mais cultivado mundialmente (representa cerca de 22% dos cogumelos cultivados), sendo *Pleurotus*, o segundo mais cultivado, juntamente com *Auricularia*, correspondendo a 19 e 17% dos cogumelos cultivados mundialmente, respectivamente. *Agaricus* e *Flammulina* representam 15 e 11% da produção (Royse *et al.*, 2017).

O Brasil ainda não é um país autossuficiente na produção, mas o interesse e o consumo de cogumelos vêm crescendo nos últimos anos. Entre os maiores produtores no país, destaca-se o estado de São Paulo (Mogi das Cruzes, Pinhalzinho, Ibiúna, Sorocaba, Salto, Cabreúva, Juquitiba e Valinhos) e Paraná (Castro, Tijucas e Curitiba) e, alguns registros nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, sul da Bahia, Pernambuco, Brasília e Rio Grande do Sul, totalizando cerca de 300 produtores, majoritariamente micro e pequenos produtores (Guimarães, 2017).

Inicialmente, os cogumelos eram obtidos a partir de sua colheita na natureza, posteriormente, sua produção passou a ser de forma rústica, a partir de inóculos introduzidos em troncos de madeira. Por volta da década de 60, ficou estabelecida a produção de cogumelos utilizando-se serragens de madeira e/ou resíduos agroindustriais, bem como gramíneas, sendo essa última técnica conhecida como “Jun-Cao” (Cardoso, 2013).

2.1. Cultivo sólido ou fermentação em estado sólido

O cultivo sólido consiste, basicamente, em dois tipos: a) em que os substratos, normalmente resíduos agrícolas e/ou gramíneas são fermentados naturalmente (compostagem) e passam por um processo de pasteurização, sendo posteriormente inoculados, incubados e levados à fase de produção, b) cultivo axênico, que consiste na utilização de subprodutos provenientes de práticas agrícolas e/ou florestais como bagaço de cana e serragem, dos quais são formulados os substratos, esterilizados em autoclaves a 121°C, inoculados, incubados e levados à sala de produção. O processo é realizado em condições ambientais controladas (temperatura, umidade, luminosidade, circulação de ar, etc).

Entre os parâmetros importantes a serem considerados em um cultivo sólido, a composição do substrato exerce importância decisiva no processo produtivo, uma vez está estritamente relacionado ao teor de umidade e balanço carbono/ nitrogênio e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do cogumelo. Em condições axênicas, o conteúdo de água no substrato deve variar entre 70 e 80%, de forma a proporcionar a absorção de nutrientes pelas hifas fúngicas, assim como viabilizar a ocorrência das reações metabólicas essenciais para o desenvolvimento dessas hifas, garantindo a colonização uniforme e completa de um substrato, para posterior formação dos corpos de frutificação (Figueiró, 2009; Gaitán-Hernández *et al.*, 2017).

O carbono, em particular, consiste em um elemento químico essencial para a formação de estruturas (base para a síntese de proteínas e outras moléculas) e composição de células que irão formar o corpo de frutificação (compõem cerca de 50% da massa seca dos cogumelos), ao passo que, o nitrogênio é essencial para a formação de proteínas dos corpos de frutificação, entretanto, quando em altas concentrações no substrato, esse elemento químico pode inibir a produção de hifas e, conseqüentemente, a colonização do substrato e desenvolvimento do fungo (Cueva *et al.*, 2017).

Assim, um dos aspectos primordiais para a seleção do substrato a ser utilizado em um cultivo sólido é a relação carbono/nitrogênio, já que apresenta papel fundamental no crescimento dos cogumelos, influenciando diretamente a taxa de colonização micelial de um substrato, uma vez que determinam as propriedades físico-químicas, como tamanho, porosidade e trocas gasosas (Cueva *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2018). É importante ressaltar que, a escolha e o preparo do substrato de cultivo muitas vezes dependem da espécie fúngica, da disponibilidade e custo do resíduo, sendo assim, imprescindível determinar o resíduo que proporciona maior produção de cogumelos, aliado à melhor composição nutricional do mesmo e à redução de custos (Sales-Campos, 2008).

Entre os diferentes métodos de cultivo sólido desenvolvidos, a técnica chinesa conhecida como “Jun-Cao”, onde “jun” significa cogumelo e “cao” significa grama, apresenta importantes aspectos sobre o processo de produção, de forma a aumentar a biomassa produzida e redução do tempo de frutificação (Rolim *et al.*, 2014).

Essa técnica visa basicamente à utilização de matérias-primas de fácil aquisição, como por exemplo as gramíneas. Desta forma, além da possibilidade de geração de um produto de alto valor nutritivo, funcional, comercial e industrial, como o cogumelo, contribui para diminuição de impactos ambientais gerados pelo descarte de resíduos provenientes do processamento agroindustrial, além de esses substratos pós-cultivo poderem ser utilizados

para diversos outros fins, como na composição de rações animais, biorremediação e adubação orgânica (Sales-Campos, 2008; Saad *et al.*, 2017).

Seguindo a temática de cultivo axênico e o bioma Amazônico, algumas pesquisas têm sido conduzidas, primeiramente com linhagens locais e comerciais, visando ao aproveitamento de resíduos lignocelulósicos da Amazônia, dada a grande diversidade de espécies vegetais, com intuito de obter uma maximização na produção e composição nutricional de cogumelos, prática ainda não muito desenvolvida na região e, futuramente, direcionar aspectos do cultivo para a síntese e obtenção de moléculas bioativas com possível aplicação industrial.

2.2. Cultivo líquido ou submerso

Os primeiros relatos de aplicação de cultivo líquido com cogumelos datam de 1948, conduzidos por Humfeld e, posteriormente, desenvolvido por Humfeld e Sugihara entre 1949 e 1952, com a finalidade de se reduzir custos e obter uma produção em larga escala (Sugihara e Humfeld, 1954).

O cultivo líquido, também conhecido como fermentação submersa, tem se destacado como uma alternativa para a produção de biomassa micelial e seus metabólitos bioativos, devido às suas potenciais vantagens, incluindo a necessidade de menor espaço físico, menor tempo e diminuição da contaminação (Kim *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2007). Esse tipo de fermentação é adotado, principalmente, quando o enfoque é obter um princípio ativo e/ou aplicar suas propriedades nutritivas como um suplemento alimentar, ou fármaco (Rathore *et al.*, 2019). Contudo, diferentemente da fermentação sólida, o produto final obtido é uma biomassa micelial, constituída, basicamente por hifas (constituem o corpo vegetativo do fungo) (Smith *et al.*, 2002; Clementino & Rosado, 2011). Adicionalmente, muitos dos compostos bioativos têm sido obtidos a partir do caldo de cultivo, sendo, portanto, um dos principais alvos da pesquisa científica atual.

Os estudos envolvendo a fermentação submersa de cogumelos têm sido direcionados, principalmente, para a otimização do processo, onde inclui-se a composição dos meios de crescimento (concentração de carbono, nitrogênio e minerais), agitação, temperatura, pH, densidade e morfologia do inóculo. No caso específico do uso de biorreatores para o processo fermentativo, leva-se ainda em consideração parâmetros como a demanda de oxigênio, taxa de agitação e aeração (Rubel, 2006).

Nesse sentido, a partir de variações nas condições de fermentação submersa, o metabolismo do fungo pode ser induzido a produzir determinados compostos, assim como, pode favorecer o acúmulo de biomassa (Bettin, 2010).

O processo de otimização submersa ainda é escasso, sendo a maioria dos resultados voltados à produção de exopolissacarídeos, antimicrobianos e compostos antioxidantes, onde os parâmetros como temperatura, pH inicial, agitação, fonte de carbono, concentração de macro e micronutrientes, taxa de inoculação e tempo de cultivo têm sido relatados como influenciadores diretos da fermentação líquida e produção de compostos bioativos (Kim *et al.*, 2002; Berovic e Podgornik, 2019).

Desta forma, considerando a necessidade de um tempo reduzido de uma fermentação submersa, quando comparado ao cultivo sólido (podendo prolongar-se por meses), é possível a realização de alterações desses parâmetros físico-químicos a cada novo cultivo líquido, com a finalidade de otimizar a produção de biomassa e/ou outros produtos de interesse (compostos bioativos), sem que haja aumento excessivo nos custos (Elisashvili, 2012; Abdullah *et al.*, 2013). Para tanto, normalmente, estes testes são realizados em frascos pequenos, sob condições estáticas ou agitadas, variando-se a composição do meio, de forma a determinar as melhores condições de cultivo (melhor resposta de biomassa micelial e/ou compostos), para posterior escalonamento em biorreator, reduzindo o risco de falha no processo a nível industrial.

Após a determinação dos parâmetros ótimos do cultivo líquido de um cogumelo, utiliza-se biorreatores visando o aumento da escala produtiva do fungo, ou antibióticos, enzimas, hormônios, entre outros compostos de aplicação industrial (Camelini *et al.*, 2014; Berovic e Podgornik, 2019). Vários tipos de biorreatores estão disponíveis no mercado, cujo princípio é a agitação e aeração do sistema, podendo ser de bandejas, tambor rotatório e tambor agitador, com aeração não-forçada, ou ainda, biorreatores de leito fixo, fluidizado, agitado e tambor de balanço, com aeração forçada (Camelini *et al.*, 2014; Svobodová e Novontný, 2018).

Em escala industrial, normalmente, utiliza-se biorreatores de fermentação aerada, sendo 90% representados pelo tipo tanque agitado tradicional. Os outros 10% constituem os biorreatores pneumáticos, sem agitação mecânica, como por exemplo *airlift* e coluna de bolhas. A vantagem no uso desses últimos biorreatores é que evitam problemas de cisalhamento das células, muitas vezes ocasionados pelo alto grau de agitação das pás do agitador, necessário para promover a transferência de massa e oxigênio, nos biorreatores de tanque agitado (Camelini *et al.*, 2014).

Entre os principais produtos, provenientes da fermentação submersa de cogumelos, destacam-se as proteínas, enzimas, ácidos, antibióticos, polissacarídeos, alcaloides, esteróis e triterpenoides, além da biomassa para a utilização como suplemento alimentar (Elisashvili, 2012; Berovic e Podgornik, 2019).

Outra aplicação importante para a fermentação submersa é a sua utilização como inoculante para a produção de cogumelos comestíveis, em cultivo sólido. Essa prática, tem se tornado importante uma vez que possibilita a redução do tempo de preparo do “spawn” (“semente” no cultivo sólido, cuja finalidade é a adaptação do fungo ao substrato de cultivo), além de melhorar o rendimento dos cogumelos (Liu *et al.*, 2018).

Em relação à obtenção de biomassa nutritiva, que pode ser utilizada como suplemento alimentar, alguns estudos têm sido conduzidos com o objetivo de verificar se o micélio de um cogumelo, produzido sob condições de fermentação submersa, apresenta as mesmas características nutritivas do corpo de frutificação, assim como similaridade entre constituintes (Confortin, 2006), incluindo teor de nitrogênio, proteína, glicogênio, ácidos graxos, açúcares e cinzas. Assim, a fermentação submersa desponta para uma importante introdução de cogumelos no mercado brasileiro, pela geração de biomassa para fins alimentares e ou nutraceutico (Sales-Campos, 2013).

É importante ressaltar que, apesar das vantagens da fermentação submersa de cogumelos, a eficiência e qualidade produzida de biomassa e/ou compostos bioativos é dependente da espécie fúngica, assim como do método e parâmetros físico-químicos adotados durante o crescimento.

3. Princípios bioativos dos cogumelos

Os cogumelos são bem conhecidos pelas suas propriedades nutraceuticas, sendo altamente apreciados pelos seus atributos imunomodulatório, antioxidante, antimicrobiano e antitumoral e, muitas vezes, consumidos principalmente pelos seus benefícios, do que pelo seu sabor (Abdullah *et al.*, 2017). Adicionalmente, são considerados importantes fontes fibras, incluindo quitina, hemiceluloses, mananos e polissacarídeos conhecidos como β -glicanos (Abdullah *et al.*, 2017).

Um composto nutraceutico é definido como uma substância, um alimento ou parte de um alimento responsável por proporcionar benefícios à saúde, incluindo prevenção ou tratamento de doenças (Barros *et al.*, 2008). Os principais compostos com propriedades nutraceuticas e/ou medicinais reportados nos cogumelos compreendem os terpenos, polissacarídeos, proteínas biologicamente ativas, antioxidantes, além de fibras, minerais e vitaminas, que despontam para o combate de várias doenças degenerativas (Kumar, 2019; Rathore *et al.*, 2019).

Os polissacarídeos constituem a classe de biomoléculas mais investigada em cogumelos, sendo alguns desses biopolímeros (principalmente β -glucanas ou heteropolissacarídeos) comercializados como antitumorais, imunostimuladores ou profiláticos (Erjavec *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2019). Quimicamente, esses compostos são formados por unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e, estruturalmente, fazem parte da composição de parede celular, além de servir como reserva energética, ou ainda, podem ser excretados extracelularmente como mecanismo de proteção celular (Li *et al.*, 2018).

Entre os polissacarídeos provenientes de cogumelos, o mais comum e mais estudado é o lentinano, isolado da espécie *Lentinus edodes*, ou comumente conhecida como shiitake. Este polímero é composto de uma cadeia principal de resíduos β -(1,3)-D-glicose com grupos laterais β -(1,6)-D-glicose, apresentando peso molecular em torno de 500 kDa (Giavasis, 2014; Li *et al.*, 2018). Da espécie *Ganoderma lucidum* se obtém o ganoderano, um polissacarídeo muito apreciado pela medicina tradicional asiática. A espécie *Pleurotus ostreatus* também tem sido apontada como potencial candidata para o desenvolvimento de compostos nutraceuticos e dela, tem-se extraído o pleurano, que consiste em β -(1,3/1, 6)-D-glicanos insolúveis (Giavasis, 2014).

Do ponto de vista aplicado, esses polissacarídeos têm sido intensamente investigados no tratamento do câncer, estímulo do sistema imune, assim como sua atividade profilática contra quimio e/ou radioterapia, atividade antimicrobiana e na regulação e prevenção da hiperglicemia e hipercolestolemia (Giavasis, 2014).

Compostos de origem proteica provenientes de cogumelos, por sua vez, além da importância farmacológica, apresentam grande importância nas indústrias de tecidos (celulases), detergentes (proteases e lipases), alimentos (amilases, pectinases, proteases e celulases) e de couro (proteases e lipases) (Souza *et al.*, 2008).

Enzimas ligninolíticas, como as celulases e peroxidases, vêm sendo aplicadas em inúmeros processos industriais, como por exemplo, na descoloração de diversos corantes, na degradação de poluentes orgânicos, branqueamento de polpa de celulose e na produção de combustíveis de segunda geração (Kuhad *et al.*, 2011).

As celulases compreendem o grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose, principal componente estrutural de materiais lignocelulósicos, a partir de um complexo multienzimático envolvendo a ação de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, até a completa quebra do polímero (Bentil *et al.*, 2018). Em contrapartida, as peroxidases são responsáveis pela degradação da lignina, sendo envolvido, nesse processo, a participação de três enzimas oxidativas, lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase (Durán, 2004).

A lacase tem sido uma das enzimas de degradação do complexo ligninolítico mais investigadas devido à sua capacidade em oxidar uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, como mono, di e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis, além de complexos metálicos, sendo este último, o principal interesse de sua aplicação biotecnológica (Upadhyay *et al.*, 2016).

No que concerne a proteínas bioativas provenientes de cogumelos, pode-se citar as lectinas, proteases, inibidores de proteases, proteínas imunomoduladoras, inativadoras de ribossomo, polímeros e proteínas antimicrobianas (Erjavec *et al.*, 2012; Valverde *et al.*, 2015). Entre sua aplicação fármaco-industrial, destaca-se a atuação antiproliferativa, antitumoral, imunomodulatória e inibitória da transcriptase reversa do HIV-1, além das atividades bactericidas, fungicidas e antiviral (Li *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014).

Outro grupo de extrema importância são as proteases ou peptidases, responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas de proteínas (Sabotic e Kos, 2012). A ocorrência de proteases em todos os organismos vivos sugere a sua participação fundamental no metabolismo e regulação de muitos processos biológicos, como por exemplo, na regulação da expressão gênica, replicação do DNA, transporte de proteínas, crescimento e diferenciação celular (Sabotic e Kos, 2012). Assim, as proteases compreendem o grupo de enzimas mais exploradas industrialmente, sendo principalmente, aplicadas na indústria de detergentes, laticínios, carnes, panificação, couro e do leite (Pimenta, 2018).

Além das moléculas já citadas, os compostos antioxidantes provenientes de cogumelos têm sido intensamente estudados, uma vez que o estresse oxidativo ocasionado pelo desequilíbrio no metabolismo e uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem acarretar em uma série de distúrbios como diabetes, artrite, mal de Parkinson, Alzheimer e problemas de envelhecimento (Kozarski *et al.* 2015). Assim, os cogumelos surgem como uma alternativa nas defesas antioxidantes, podendo ser usados diretamente por meio da suplementação, reduzindo, assim, o nível de estresse oxidativo. Muitos cogumelos têm sido reportados por apresentar propriedades antioxidantes, tanto nos micélios como nos corpos de frutificação, com ênfase para o gênero *Agaricus*, *Boletus*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Pleurotus* e *Termitomyces* (Kozarski *et al.*, 2015; Sales-Campos e Nascimento, 2015; Sales-Campos *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos compreendem a principal classe de moléculas com atividade antioxidante isoladas de cogumelos e apresentam em sua estrutura anéis aromáticos com uma ou mais hidroxilas, capazes de doar um hidrogênio a um radical livre (Dubost *et al.*, 2007). Assim, as propriedades antioxidantes desses compostos proporcionam a diminuição dos níveis de radicais livres, estabilização de íons metálicos e modulação de enzimas antioxidativas do organismo vivo (Ozcan *et al.*, 2014).

4. Potencial biotecnológico de cogumelos amazônicos

No que diz respeito aos cogumelos amazônicos, estudos acerca de sua produção em diferentes sistemas (fermentação sólida e líquida), suas propriedades nutracêuticas, assim como de seus compostos bioativos ainda

são escassos, principalmente quanto ao processo de otimização da fermentação submersa visando a síntese de moléculas específicas para produção em escala industrial. Neste contexto, a maioria dos estudos envolvendo cogumelos amazônicos se detêm a investigar a presença de compostos bioativos a partir dos corpos de frutificação coletados na própria floresta e/ou a partir de micélios crescido sob meio sólido em placas.

Desta maneira, estudos iniciais de cultivo de cogumelos selvagens são importantes para o entendimento do metabolismo do fungo, assim como para se obter uma maximização da produção. De posse desses dados, pode-se tomar decisões acerca de outras potenciais aplicabilidades dos cogumelos produzidos, incluindo a obtenção de moléculas bioativas e/ou obtenção de um alimento nutracêutico. Nesse sentido, as primeiras pesquisas a serem desenvolvidas devem ser conduzidas no sentido de selecionar resíduos e espécies mais aptas à produção e de composição nutricional superior.

Diante desse cenário, estudos têm sido realizados no Laboratório de Cultivo de Cogumelos Comestíveis (LCFC), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, com o objetivo de selecionar espécies (nativas ou comerciais) e resíduos regionais, como serragens de madeira e/ou resíduos provenientes da agroindústria, com o objetivo de otimizar o processo produtivo de cogumelos. Assim, reunindo dados dessa linha pesquisa, pode-se inferir que, uma espécie de *Pleurotus ostreatus*, nativa da Amazônia, quando cultivada de modo axênico em engaço de banana apresentou maior eficiência biológica (EB) na cultivar thap-maeo (53,44%), seguido da cultivar prata-anã (30,12%). Quando cultivado em casca de tucumã, esse fungo apresentou EB de 33,61% e, aplicando a técnica Jun-Cao, utilizando-se como substrato uma mistura de campim-elefante e cajuí, a BE foi de 86,4%. Nesse último experimento, também foram testadas outras espécies amazônicas nesse mesmo substrato, sendo a BE encontrada para *Pleurotus ostreatusroseus* de 46,9%, ao passo que, para *Lentinus strigosus* não foi obtida a produção de primórdios, necessários para o desenvolvimento do corpo de frutificação. Em outro estudo, os índices de eficiência biológica (EB) *Lentinus strigosus*, cultivados em três diferentes substratos formulados (substrato a partir de serragem de cajuí; pau-de-balsa e marupá) foram: 58,58; 47,50 e 37,95%, respectivamente.

Em cultivo axênico, utilizando-se a uma linhagem comercial de *Pleurotus*, variando os resíduos na formulação do substrato, o cogumelo apresentou maior produtividade, com eficiência biológica (BE) de 126,6% em resíduo de pupunheira; 99,8% em cana-de-açúcar; 94% em marupá e 64,6% em pau-de-balsa. Adicionalmente, em diferentes cultivares de banana, a maior EB foi para o pseudocaule de Thap maeo (62%). Suas composições centesimais também variaram com o substrato de cultivo, o que indica a necessidade de formulações para obtenção da molécula alvo.

No que concerne aos estudos envolvendo compostos bioativos desses cogumelos, ainda são poucos os trabalhos realizados visando à obtenção dessas moléculas, contudo, recentemente, têm sido alvo dos projetos de mestrado e doutorado desenvolvidos no laboratório, sendo assim, muitos dados ainda não foram publicados.

A partir de resultados preliminares pode-se inferir que a espécie *Pleurotus ostreatus*, nativa da Amazônia, apresenta grande potencial para a produção de enzimas responsáveis pela degradação do complexo ligninolítico, expressando pico máximo de atividade de lacases no quinto dia de cultivo em resíduo do engaço e pseudocaule de banana. Ainda sobre essa mesma linhagem fúngica, foi possível avaliar a produção de polissacarídeos quando cultivado em cajuí, assim como para outra espécie nativa, *Lentinus strigosus*. Em resíduo de marupá, *P. ostreatus* também apresentou potencial em produzir polissacarídeos, contudo, em menores proporções.

Outro fungo amazônico, *Trametes cubensis* também desponta para o potencial em produzir enzimas degradativas onde, em cultivo sólido, apresentou maiores atividades para a lacase no substrato composto de bagaço de cana e solução nutritiva de Karp. Em contrapartida, quando cultivado em meio líquido, essa atividade é superior em meio malte. A atividade de lignina peroxidase expressa por *T. cubensis* foi maior em bagaço de cana misturado com marupá (cultivo sólido) e em meio Czapek contendo ABTS (cultivo líquido). A atividade manganês peroxidase também foi maior em bagaço de cana misturado com marupá (cultivo sólido), contudo, no cultivo líquido, o meio malte contendo sulfato de cobre resultou nos maiores valores.

No que diz respeito às biomoléculas de origem proteica dessas linhagens de cogumelos da Amazônia, estudos envolvendo a detecção da atividade de proteases, inibidores de proteases e lectinas ainda estão sendo conduzidos, tanto a partir dos corpos de frutificação, produzidos em cultivo sólido utilizando-se resíduos regionais, como da biomassa micelial e/ou caldo de fermentações submersas. A partir dos resultados obtidos nesses experimentos, pretende-se ainda proceder ensaios de otimização e, posteriormente, escalonamento em biorreator.

De posse da potencialidade dos fungos amazônicos, principalmente de *Pleurotus ostreatus*, em produzir enzimas hidrolíticas do complexo ligninolítico, e com o objetivo de fechar a cadeia do processo de reciclagem de resíduos provenientes do processamento madeireiro e/ou agroindustrial, de forma a reduzir possíveis impactos ambientais, pesquisas estão sendo conduzidas no sentido de aproveitar os resíduos pós-cultivo do cogumelo, ou seja, já com a parte indigerível desse material hidrolisada, no processo de formulação de ração animal e produção de papel.

5. Conclusão

Diante do exposto, linhagens de cogumelos amazônicos apresentam grande potencial para produção em larga escala, visando atender ao mercado local de cogumelos, além de colaborar na cadeia de reciclagem de resíduos descartados no meio ambiente. Adicionalmente, desponta para uma importante obtenção de biomoléculas ativas de aplicação industrial.

6. Referências

- Abdullah N., Abdulghani R., Ismail S. M., Abidin M. H. Z. 2017. Immune-stimulatory potential of hot water extracts of selected edible mushrooms. *Food and Agricultural Immunology*, 28(3): 374-387.
- Abdullah N., Ismail R., Johari N.M.K., Annuar M.S.M. 2013. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia Horticulture*, 161: 65-69.
- ANPC – Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. 2013. O setor de cogumelos. <https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>. Acesso em: 10.09.2018.
- Barros L., Cruz T., Baptista P., Estelvinho L.M., Ferreira I.C.F.R. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2742-2747.
- Bentil J.A., Thygesen A., Mensah M., Lange L., Meyer A.S. 2018. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14): 5827-5839.
- Berovic M., Podgornik B.B. 2019. Engineering aspects of lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) biomass submerged cultivation in bioreactors: A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21(3): 253-265.
- Bett C.F., Perondi M.A. 2011. Análise do mercado de cogumelos comestíveis e medicinais: uma prospecção de alternativa de renda para a agricultura familiar na região sudoeste do Paraná. *Synergismus científica UTFPR*, 6(1): 1-9.
- Bettin F. 2010. *Cinética de crescimento e produção de lacases do fungo Pleurotus sajor-caju OS-2001 (Fr.) Singer em processo submerso em biorreator com agitação mecânica*. Caxias do Sul, Brasil. (Dr. Tese Universidade de Caxias do Sul). UCS. 230p.
- Camelini, C. M, Rossi, M. J. Cardozo, F. T. G. S, Gomes, A, Sales-Campos C, Giachini, A.J. 2014. Fungal Cultivation and Production of Polysaccharides. *Polysaccharides*. Springer International Publishing Switzerland 1-34P.
- Cardoso J.C.P. 2013. *Cultivo do cogumelo comestível Pleurotus ostreatus em bagaço de bociúva pela técnica Jun-Cao*. Dourados, Brasil. (Graduação, Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Grande Dourados). UFGD. 29p.
- Confortin F.G. 2006. *Produção de biomassa fúngica da linhagem OS-2001 de Pleurotus sajor-caju (Fr.) Singer em cultura submersa*. Caxias do Sul, Brasil. (M.Sc. Dissertação Universidade de Caxias do Sul). UCS. 95p.
- Clementino L. da S., Rosado F.R. 2011. Cultivo submerso de *Ganoderma lucidum* (Curt. Ex Fr.) Karst em diferentes meios de cultura. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, 4(1): 131-144.
- Cueva M.B.R., Hernández A., Niño-Ruiz Z. 2017. Influence of C/N ratio on productivity and the protein contents of *Pleurotus ostreatus* grown in different residue mixtures. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(2): 331-344.
- Dubost N.J., Ou B., Beelman R.B. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2): 727-735.
- Durán, N. 2004. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Educ, Caxias do Sul, 246p.

- Elisashvili, V. 2012. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(3): 211-239.
- Erjavec, J., Ravnikar, M.; Brzin, J.; Grebenc, T.; Blejec, A.; Gosak, M.Z.; Sabotic, J.; Kos, J.; Dreo, T. 2016. Antibacterial activity of wild mushroom extracts on bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*, 100(2): 453-464.
- Erjavec, J.; Kos, J.; Ravnikar, M.; Dreo, T.; Sabotic, J. 2012. Proteins of higher fungi – from forest to application. *Trends in Biotechnology*, 30(5): 259-273.
- Figueiró G.G. 2009. *Influência do substrato no cultivo e na composição química do cogumelo Pleurotus ostreatus*. Ilha Solteira, Brasil (M.Sc. Dissertação Universidade Estadual Paulista). UNESP. 65p.
- Furlani R.P.Z., Godoy H.T. 2005. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 64(2): 149-154.
- Gaitán-Hernández R., Zavaleta M.A.B., Aquino-Bolaños E.N. 2017. Productivity, physicochemical changes, and antioxidant activity of shiitake culinary- medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) cultivated on lignocellulosic residues. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(11): 1041-1052.
- Giavasis I. 2014. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 26: 162-173.
- Guimarães E. 2017. Saiba por que consumo de cogumelo tem aumentado entre brasileiros. [on line]. Disponível em: <<https://www.em.com.br>> Acesso em: 8 jun. 2019.
- Jin Z., Li Y., Ren J., Qin N. 2018. Yield, nutritional content, and antioxidant activity of *Pleurotus ostreatus* on corncobs supplemented with herb residues. *Mycobiology*, 46(1): 24-32.
- Kim S.W., Hwang H.J., Park J.P., Cho Y.J., Song C.H., Yun J.W. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 56-61.
- Komura D.L. 2016. *Macrofungos Agaricales em áreas de manejo florestal na Amazônia Central*. Manaus, Brasil (Dr, Tese. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). INPA. 367p.
- Kozarski M., Klaus A., Jakovljevic D., Todorovic N., Vunduk J., Petrovic P., Niksic M., Vrvic M., van Griensven L. 2015. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20: 19489-19525.
- Kuhad R. C., Gupta R., Singh A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011: 1-10.
- Kumar K. 2019. Nutraceutical potential and processing aspects of oyster mushrooms (*Pleurotus* Species). *Current Nutrition & Food Science*, 15: 1-12.
- Li W., Wang J., Hu H., Li Q., Liu Y., Wang K. 2018. Functional polysaccharide lentinan suppresses human breast cancer growth via inducing autophagy and caspase-7-mediated apoptosis. *Journal of Functional Foods*, 45: 75-85.
- Liu S.R., Zhang W.R., Kuang Y.B. 2018. Production of stalk Spawn of an edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in liquid culture as a suitable for stick spawn in mushroom cultivation. *Scientia Horticulturae*, 240: 572-577.
- Ma G., Yang W., Zhao L., Pei F., Fang D., Hu Q. 2018. A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Science and Human Wellness*, 7: 125-133.
- Maciel M.J.M., Castro A.S., Ribeiro H.C.T. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of biotechnology*, 64(1):26-52.
- Mielgo I., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. 2001. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *Journal of Biotechnology*, 89:99-106.
- Ozcan T., Akpinar-Bayazit A., Yilmaz-Ersan L., Delikanli B. 2014. Phenolics in human health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5): 393-396.
- Pimenta L. 2018. Avaliação da produção de proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*. Manaus, Brasil. (Graduação. Trabalho de Conclusão de Curso). UFAM. 37p.
- Rathore H., Prasad S., Kapri M, Tiwari A., Sharma S. 2019. Medicinal importance of mushroom mycelium: mechanisms and applications. *Journal of Functional Foods*, 56: 182-193.

- Rolim L.N., Sales-Campos C., Cavalcanti M.A.Q., Urben A.F. 2014. Application of chinese Jun-Cao Technique for the production of Brazilian *Ganoderma lucidum* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(3): 367-373.
- Royse D.J., Baars J, Tan Q. 2017. *Current overview of mushroom production in the world*. In: Zied D.C., Pardo-Giménez A (ed.). *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*. John Wiley & Sons Ltd. 1-9p.
- Rubel R. 2006. *Produção de compostos bioativos de Ganoderma lucidum por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica*. Curitiba, Brasil. (Dr. Tese de doutorado). UFPR. 191p.
- Saad A.L.M, Viana S.R.F., Siqueira O.A.P.A., Sales-Campos C., Andrade M.C.N. 2017. Aproveitamento de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* utilizando a tecnologia chinesa “Jun-Cao”. *Ambiência*, 13(3): 271-283.
- Sabotic J., Kos J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 1351-1375.
- Sales-Campos, C. Aproveitamento de Resíduos Madeireiros e do Agro-indústria Regional para o Cultivo de Fungos Comestíveis de Ocorrência na Região Amazônica. Tese de doutorado em biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, pp.183, 2008.
- Sales-Campos, C. 2013. Bioeconomia um nicho inexplorado. *Revista PIM (Polo Industrial de Manaus)* 28-35p.
- Sales-Campos, C.; Nascimento, C.S. 2015. Total polyphenols and antioxidant activity of two strains of *Pleurotus* from Brazil. IN: *The 8th International Medicinal Mushrooms Conference*. Mazinalle, Colômbia, p.114.
- Sales-Campos, C.; Nunes, H. H.C.A.; Chevreuil, L.R.; Tavares, L.B.B.; Albertó, M.D.; Aguiar, L. V. B. 2017. Total polyphenols and antioxidant activity of a wild strain of *Pleurotus* from Amazonian-Brazil, In: *The 9TH International Medicinal Mushrooms Conference*, p.85-86. Palermo, Itália.
- Shibata C.K.R., Demiate I.M. 2003. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril). *Publicatio UEPG Biological and Health Sciences*, 9(2): 21-32.
- Shih I.L., Tsai K.L., Hsieh C. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolic production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal*, 33: 193-201.
- Shirur M., Shivalingegowda N.S. 2015. Mushroom marketing channels and consumer behaviour: a critical analysis. *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 49(2):390-393.
- Smith J.E., Rowan N.J., Sullivan R. 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactives. *Biotechnology Letters*, 24: 1839-1845.
- Souza H.Q., Oliveira L.A., Andrade J.S. 2008. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(supl.): 116-124.
- Sugihara T.F., Humfeld H. 1954. Submerged culture of the mycelium of various species mushroom. *Applied Microbiology*, 2(3): 170-172.
- Svobodová K., Novotný C. 2018. Bioreactors based on immobilized fungi: bioremediation under non-sterile conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 39-46.
- Trapp T., Zajul M., Ahlborn J., Stephan A., Zorn H., Fraatz M.A. 2018. Submerged cultivation of *Pleurotus sapindus* with molasses: aroma dilution analyses by means of solid phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10): 2393-2402.
- Upadhyay P., Shrivastava R., Agrawal P.K. 2016. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(15): 1-12.
- Valverde M.E., Hernández-Pérez T., Paredes-López O. 2015. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 1-14.
- Zhang W., Tian G., Geng X., Zhao Y., Ng T.B., Zhao L., Wang H. 2014. Isolation and characterization of a novel lectin from the edible mushroom *Stropharia rugosoannulata*. *Molecules*, 19: 19880 – 19891.

Macrofungos comestíveis e medicinais

URBEN, Arailde Fontes

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; Email: arailde@cenargen.embrapa.br

Resumo

Os macrofungos (cogumelos) são um grupo especial de fungos, pelo seu tamanho macroscópico, variedade de formas, cores, tamanhos e produção de milhões de esporos. Na natureza, existem além de cogumelos comestíveis e medicinais, os tóxicos, venenosos e alucinógenos que também têm propriedades farmacológicas e podem ser utilizados como tratamento complementar, nas mais diversas patologias clínicas, entre elas, o autismo e o câncer. É um produto natural com elevadas propriedades nutricionais e medicinais que necessitam de cuidados especiais, para que seus nutrientes e princípios ativos, mantenham-se inalterados, caso contrário, ocorrerá um desencadeamento de processos bioquímicos que culminarão com a deterioração do mesmo e *consequente* redução das suas atividades nutricêuticas. A grande variabilidade genética de cogumelos cultivados e nativos, existentes em todo o mundo, representa uma fonte proteica essencial para a saúde humana. A sua importância na saúde humana é devido à presença não somente de proteínas de alto valor biológico, presentes na sua composição química como também de vitaminas e elementos minerais tais como: fósforo, magnésio, cálcio e ferro, entre outros. Os cogumelos- corpo frutífero, micélio ou esporos- apresentam inúmeras aplicações científicas e tecnológicas, como na indústria alimentícia, farmacêutica e na agricultura. Sua relevância nutricional está relacionada às proteínas de alta qualidade, aos carboidratos, aos lipídeos, as vitaminas e as fibras. Além disso, esses organismos são fontes importantes de substâncias bioativas e apresentam diversas propriedades medicinais: antitumoral, antiviral, anticoagulante, antioxidante, antimicrobiana, entre outras. Os fármacos produzidos pelo *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei* e *Flammulina velutipes*, possuem atividades antitumorais, anti-AIDS, anticolesterol, etc., vem sendo comercializados a um elevado preço, principalmente em países asiáticos e europeus. Os macrofungos têm sido utilizados na imunoterapia, dentro da medicina complementar. A utilização de algumas espécies tem dado excelentes respostas, mesmo em uso isolados, em conjunto com terapias ou tratamento convencionais.

Palavras-chave: Macromicetos, antitumoral, substâncias bioativas.

1. Introdução

Os macrofungos têm sido considerados um grupo especial de fungos pelo seu tamanho macroscópico, distinto corpo de frutificação e produção de bilhões de esporos. Suas frutificações podem ser de cores vivas (amarelo, laranja, vermelho, violeta ou verde) escuras (marrom ou preto) ou sem coloração (branco ou hialino), de consistência carnosa frágil à coriácea resistente, morfologia bastante variável e formas curiosas (Urben e Oliveira, 1998) e (Urben *et al.*, 2017) (Figura 1).

Na antiguidade, os fungos tiveram um importante papel cultural no Oriente, Grécia e na América Central.

São conhecidos pelos povos asiáticos, desde os primórdios da sua história, seja pela sua toxidez ou pelas suas propriedades nutricionais e medicinais. O homem primitivo já se alimentava desses macromicetos no período entre 5.000 a 4.000 anos a.C. e logo aprendeu a valorizá-los como alimento (Zhanxi, 1995; Urben *et al.*, 2004, 2017).

Os fungos fazem parte da terapia chinesa há muitos séculos. Os seus efeitos nutricionais foram registrados no livro “SHEN NUNG’S HERBAL”, escrito há 2.000 anos (Amazonas, 1999, Urben *et al.*, 2004, 2017).

Os cogumelos e os seus benefícios também foram relatados por escritores gregos e romanos, entre eles, Hipócrates o “Pai da Medicina”, no século IV a.C. Os fungos medicinais, como por exemplos: *Ganoderma lucidum* é conhecido na China, há mais de 2.000 anos, *Poria cocos*, 1.800 anos e *Auricularia polytricha*, 500 a 600 anos d.C. (Zhanxi, 1995; Urben, *et al.*, 2004, 2017).

Eles representavam uma classe especial de alimentos. Os gregos acreditavam que a força dos guerreiros nas batalhas era proveniente dos cogumelos que eles consumiam; os faraós no Egito consideravam os cogumelos como sendo um alimento dos deuses; para os romanos representavam um prato especial que só era servido em ocasiões festivas e os chineses consideravam um alimento saudável e acreditavam que fosse o “elixir da vida” (Chang e Miles, 1989, Urben *et al.*, 2017).



Figura 1. Formas, cores e texturas variadas.

Apesar dos cogumelos serem considerados um alimento especial, algumas espécies também podem ser tóxicas, alucinógenas, venenosas e medicinais (Figura 2). Existem relatos de intoxicação e morte na América e Europa devido ao consumo de cogumelos silvestres. Os sintomas causados pela ingestão de cogumelos tóxicos ou venenosos são: vômito, diarreia, dores gastrointestinais, depressão, fotofobia e disfunção hepática aguda. No México, os fungos alucinógenos também são conhecidos como psicotrópicos ou neurotrópicos, eram usados pelos índios em rituais religiosos e também como medicamentos. O gênero *Psilocybe*, comum naquele país, era considerado um produto divino (Aurora, 1986; Alberto, 2010).

2. Valor Nutricional dos Cogumelos

A importância da nutrição humana, assim como os benefícios dos suplementos dietéticos têm sido altamente estudados por cientistas no mundo inteiro, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e prevenir doenças. A escolha da linhagem, do substrato, do composto, os diversos estágios de desenvolvimento do basidiocarpo e as condições climáticas são fatores fundamentais para que haja uma melhor absorção de nutrientes e produção de princípios ativos nos cogumelos (Urben, 2004; Albertó, 2008; Urben *et al.*, 2017).

Os cogumelos de maior teor nutricional são baseados no índice de aminoácidos essenciais. O índice nutricional desses macrofungos supera o de vegetais e legumes (Campos, 2011).

De um modo geral, os macrofungos são constituídos de 90% de água, apresentam elevados teores em proteínas, vitaminas (**B₁** e **C**), riboflavina, niacina e biotina. Contém todos os 21 aminoácidos essenciais, os quais o homem necessita para sua nutrição. Apresentam altas concentrações de isoleucina, leucina, lisina e histidina, que estão presentes na carne em baixos teores. São ricos em sais minerais (fósforo, potássio, cálcio, sódio e ferro) de baixo valor calórico (30 cal/100g de cogumelos desidratados). Os cogumelos apresentam entre 3,5 e 4,0 % em peso fresco e de 30 a 50% em peso seco de proteína. As fibras presentes na parede celular dos cogumelos têm ação laxativa. Ajuda na digestão e atua na remoção de resíduos e toxinas intestinais, reduzindo os riscos de câncer de cólon,



Figura 2. A) *Ganoderma lucidum*; B) *Tremella fuciformis*; C) *Amanita muscaria*; D) *Psilocybe mexicana*

reto e enfermidades coronárias, entre outras. O conteúdo de fibras é também variável entre as espécies. O fungo *Flammulina velutipes*, por exemplo, tem em torno de 4% em peso seco de fibras enquanto que algumas espécies de *Auricularia* podem apresentar até 20%. (Bado, 1994; Alberto, 2008; Urben *et al.*, 2017).

3. Ácidos Graxos

O consumo de alimentos ricos em ácidos graxos/lipídeos (gorduras) pela população, tem sido uma grande preocupação por parte dos médicos em virtude do elevado índice de doenças cardiovasculares e circulatórias. Novos hábitos de vida vêm sendo adotados, como os alimentos de baixo teor calórico, entre eles, os cogumelos que têm se revelado um alimento saudável e benéfico para a saúde. (Urben *et al.*, 2017).

4. Alimentos funcionais e nutracêuticos

O êxito na aceitação de produtos especiais, como os alimentos funcionais e nutracêuticos, reside nas evidências sobre os efeitos saudáveis de certas substâncias contidas nos alimentos, reforçando a ideia de que a alimentação é um fator crítico para a manutenção da saúde e redução do risco de certas doenças. Entre os vários conceitos existentes, podem ser definidos como: **nutracêuticos**, alimentos ricos em nutrientes que são consumidos frescos ou desidratados, enquanto os **nutricêuticos** são utilizados na forma de cápsulas ou tabletes como suplementos dietéticos. Já os **farmacos** são usados terapêuticamente com acompanhamento médico e são ministrados por via oral, tópica ou injetável (Urben *et al.*, 2017).

5. Valor Medicinal dos Cogumelos

Numerosas espécies de cogumelos, além de possuírem valores nutricionais, têm efeitos terapêuticos ou medicinais, como exemplos: Cogumelo da Vida, Princesa, Piedade ou Himematsutake (*Agaricus blazei*), Shiitake (*Lentinula edodes*), Macaco branco (*Hericium erinaceus*) e Talo veludo (*Flammulina velutipes*).

Embora os cogumelos medicinais sejam utilizados pelos povos asiáticos há muitos anos, o valor medicinal dos fungos, só mereceu atenção mundial em 1927-1929, quando o médico e bacteriologista inglês, Alexander Fleming, trabalhando com uma bactéria denominada *Streptococcus* sp. em condições de laboratório, verificou que o fungo *Penicillium* sp. (contaminante do ar atmosférico) secretava uma substância, a penicilina, que inibia o crescimento da bactéria.

O interesse pelos cogumelos, por terem propriedades nutricionais e medicinais, aumentou a partir da década de 1970, com pesquisas sobre os seus efeitos terapêuticos realizadas principalmente no Japão, China, França e Estados Unidos.

São considerados alimentos funcionais e são reconhecidos pelo seu valor nutricional e pelos benefícios que proporcionam à saúde, daí serem denominados de **nutracêuticos**. São consumidos frescos ou desidratados.

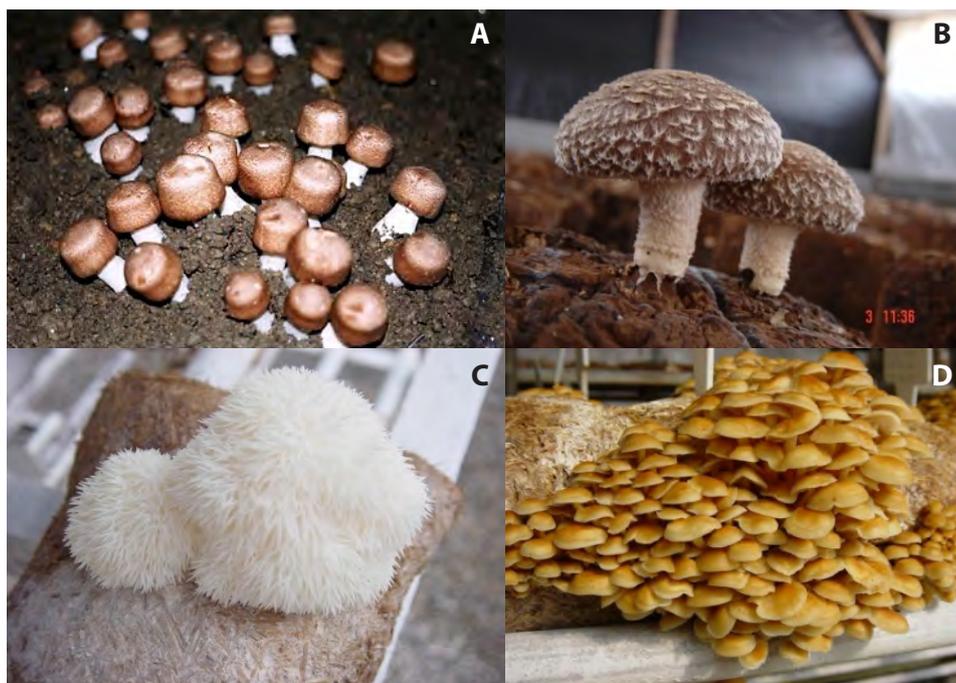


Figura 3. A) Cogumelo da Vida, Princesa, Piedade ou Himematsutake (*Agaricus blazei*), B) Shiitake (*Lentinula edodes*), C) Macaco branco (*Hericium erinaceus*) e D) Talo veludo (*Flammulina velutipes*).

Por possuir atributos medicinais, além dos nutricionais eles fazem parte do grupo dos **nutricêuticos**, cogumelos que apresentam diversas propriedades farmacológicas. Podem ser consumidos como suplementos dietéticos, tanto para prevenção, como para o tratamento de várias doenças. São utilizados na forma de cápsulas ou tabletes como suplementos dietéticos.

6. Fármacos

Os **fármacos** (preparações quimicamente definidas com propriedades medicinais específicas), derivados dos cogumelos, são utilizados para o tratamento de doenças específicas. Os mais conhecidos são: o Lentinan (*L. edodes*), Krestin (*Trametes versicolor*) e Schizophylan (*Schizophyllum commune*) (Urben *et al.* 2004 e Albertó 2008). (Urben *et al.* 2017). São usados terapêuticamente com acompanhamento médico e são ministrados por via oral, tópica ou injetável (Amazonas, 1999; Urben *et al.*, 2004, 2017)

Dentre os princípios ativos, os mais estudados pelos cientistas, são as glucanas, geralmente presentes nos cogumelos em grandes quantidades. Como exemplo, a **β -D-glucan**, um polissacarídeo existente no micélio

e nos corpos frutíferos dos cogumelos. Sua ação está diretamente ligada ao aumento das células de defesas do organismo, conhecidas como “Natural Killer” (NK) que fortalecem o sistema imunológico, criando um sistema de proteção contra vírus, bactérias, fungos e parasitas.

As glucanas também combate às toxinas do organismo e atua com um poderoso antioxidante que previne o envelhecimento das células. Eficiente como tratamento complementar do câncer.

Os cogumelos também têm **atividade antiviral**, podendo ser usado no tratamento de AIDs. Estudos com *Ganoderma lucidum* indicam que os ácidos triterpênicos, extraídos deste fungo, tem efeito sobre o HIV. Atuam sobre a membrana celular, dificultando a entrada do vírus nas células (Miles e Chang, 1997).

6.1. Efeitos farmacológicos de *Ganoderma lucidum* (Figura 4)

Analgésico; antialérgico; bronquite (efeito preventivo); anti-inflamatório; antibacteriano; antioxidante (elimina os radicais livres); antitumoral; antiviral; baixa a pressão sanguínea; baixa o teor de colesterol no sangue; baixa o teor de glicose no sangue (diabetes); auxilia na depressão, atuando no sistema nervoso central; antifadiga; artrite; arteriosclerose; AIDS; atividade anti-úlceras; hepatite B - restaura as funções do fígado.



Figura 4. *Ganoderma lucidum*

6.2. Efeitos farmacológicos de *Agaricus blazei* (Figura 5)

Atividades: anti-trombocítica; antitumoral; antiviral; antialérgico; AIDS; prevenção de diabetes; controle de colesterol alto; doenças do aparelho circulatório, digestivo, urinário e respiratório; edema; hepatite; sinusite; rinite; menopausa; lupus; diminui a pressão sanguínea; arteriosclerose e osteoporose.

Reações: No início do tratamento podem ocorrer reações de caráter transitório como: diarreia, prisão de ventre, sonolência, etc. Estas reações estão ligadas à desintoxicação do organismo e a recuperação dos órgãos debilitados.



Figura 5. *Agaricus blazei*

6.3. Efeitos farmacológicos de *Lentinula edodes* (Figura 6)

Atividades: antitumoral ; estimulante do sistema imunológico; ativa as células de defesa do organismo (NK = Natural Killer); antiviral/HIV; antibacteriana; melhora as funções do fígado; ajuda a produzir anticorpos para hepatite B; efeito cardiovascular - baixa teores de colesterol e lipídeos no sangue.



Figura 6. *Lentinula edodes*

6.4. Efeitos farmacológicos de *Pleurotus ostreatus* (Figura 7)

Atividades: antitumoral; baixa os teores de lipoproteínas no plasma sanguíneo e baixa os teores de colesterol e triglicérides no fígado; relaxante muscular e antiviral.



Figura 7. *Pleurotus ostreatus*

7. Considerações Finais

A grande variabilidade genética de cogumelos cultivados e nativos, existentes em todo o mundo, representa uma fonte de proteínas, vitaminas, minerais, fibras e carboidratos, com baixo teor de lipídeos, o que os torna um alimento adequado para ser incorporado em dietas do baixo teor calórico. Por isso, os cogumelos são tradicionalmente usados em países orientais como alimentos e para o tratamento de diversas doenças.

Substâncias como o polissacarídeo Lentinan, uma β -1,3-glucana isolada de *Lentinula edodes*, com atividade antitumoral, e a eritadenina, também produzida por esse fungo, com atividade anticolesterol têm atraído a atenção de médicos e cientistas. Os fármacos produzidos a partir de *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei* e *Flammulina velutipes* possuem atividade antitumoral, antiviral/HIV e anticolesterol e são comercializados a um elevado preço, principalmente nos países asiáticos e europeus.

Os cogumelos têm sido utilizados na imunoterapia, dentro da medicina complementar. A utilização de algumas espécies tem dado excelentes respostas, mesmo em usos isolados ou em conjunto com as terapias ou tratamentos convencionais.

A ciência tem progredido no desenvolvimento de novos tratamentos de doenças, descobrindo a natureza dos compostos bioativos e seus mecanismos de ação para serem usados em benefícios da saúde humana.

8. Referências

- Albertó E. 2008. *Cultivo Intensivo de Los Hongos Comestibles*. Editorial hesmiferio sur, 1ª Edición, 265 p.
- Amazonas M.A. de A. 1999. Curso Cultivo de Cogumelos Comestíveis e Medicinais. In: *Importância do Uso de Cogumelos: Aspectos Nutricionais e Medicinais*, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 169 p. (Apostila).
- Aurora D. 1986. *Mushroom Demystified*. 2 ed. Berkeley: Ten Speed Press, 959 p.
- Bado L.C. 1994. Produccion de hongos Comestibles. In: *Valor Nutritivo y Toxicologia de los Hongos*. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México, 108 p.
- Campos C.S. 2011. *Cultivo de Lentinus strigosus em residuo madeireiro e da agroindustria no Amazonas*. In: VI Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil. ANAIS- Proceedings. Brasília, DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.
- Canal Saúde Escelsanet. 2003. *Valor Nutritivo dos Cogumelos*. Disponível em <www.escelsanet.com.br/sitesaude> Acesso em: 03 de outubro de 2003.
- Chang S.T., Miles P.G. 1997. The Nutritional Attributes and Medical Value of Edible Mushroom. In: *Edible Mushrooms and their cultivation*. CCR Press. p. 27-40.
- Hayes W.A., Wrigth S.H. 1979. Edible Mushrooms. In. Rose, A. H. (Ed.) *Economic Microbiology: Microbial Biomass*. London, Academic Press, p. 31-176.
- Hobbs C. 1995. *Medicinal Mushrooms – An Exploration of Tradition, Healing, & Culture*. Botanica Press, Santa Cruz, Ca. 252 p.
- Macedo A.C., Souza J.L.R., Santos T.S., Sousa V.S.S., Cabral V.B. 2013. Escorbuto e Beriberi: Patologia metabólica de origem nutricional. Disponível em <https://pt.slideshare.net/VictorSaid/escorbuto-e-beriberi>. Acesso em 07/02/2019.
- Miles P.G., Chang S.T. 1997. *Mushroom Biology: Concise basics and current developments*. Singapore: World Scientific, 194 p.
- Mizuno T., Wang G., Zhang, J., Kawagishi H., Nishitoba T., Li J. 1997. *Reishi, Ganoderma lucidum and Ganoderma tsugae: bioactive substances and medical effects* – <http://www.mikei.com/REISHI1997-6.htm>, 16 p. 1997.
- Pegler D.N. 1983. The genus *Lentinula* (Tricholomataceae tribe Collybieae). *Sydowia*, 36:227-239.
- Urban A.F. 2004. *Fatores que afetam a assimilação de nutrientes e produção de princípios ativos nos cogumelos*. In: II Simpósio Internacional sobre cogumelos no Brasil. Documentos 116. ANAIS- Proceedings. Brasília, DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2004.
- Urban A.F., Oliveira C. 1998. Cogumelos Comestíveis: Utilização e Fontes Genéticas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 6:173-196.
- Urban A.F., Oliveira H.C.B., Vieira W., Correia M.J., Uriartt H.A., Santos J.K.P., Ribeiro V.L. 2004. *Produção de Cogumelos por meio de Tecnologia Chinesa Modificada*, 2ª ed., revista e ampliada, p.187.
- Urban A.F., Uriartt A.H., Castro C.S.P., Magarelli G., Oliveira H.C.B., Santos J.K.P., Correia M. J., Souza M.L.S., Ribeiro V.L., Polez V.L.P., Vieira W. 2017. *Produção de Cogumelos por meio de Tecnologia Chinesa Modificada*, 3ª ed., revista e ampliada, p. 272.
- Zhanxi L., Zhanzhua L. 1995. *Fungi cultivation with Jun-Cao*. Fuzhou: Asia-Pacific Cultivation Training Center. 110 p.

Fungos corticioides do Brasil: revisão e novidades taxonômicas

LIRA, Carla Rejane Sousa¹; CHIKOWSKI, Renata dos Santos¹; XAVIER DE LIMA, Vitor¹; LARSSON, Karl Henrik²; GIBERTONI, Tatiana Baptista¹.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Recife, PE

² Museu de História Natural, Universidade de Oslo, Noruega

Emails: carla-rejane@hotmail.com, renatachikowski@hotmail.com, vitorxlima@gmail.com, k.h.larsson@nhm.uio.no, tbgibertoni@hotmail.com

Resumo

Os fungos corticioides apresentam basidiomas geralmente ressupinados com himenóforo liso, mas apesar da aparente simplicidade macromorfológica, estes organismos possuem uma vasta variedade micromorfológica no himênio, subhimênio e subículo. São de grande importância ecológica, pois participam ativamente da ciclagem de nutrientes nos ecossistemas onde se encontram. No Brasil, ainda são escassos os estudos sobre a diversidade desses fungos, sendo relatadas 350 espécies no país, das mais de 1800 registradas para o grupo. Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a diversidade de fungos corticioides no país, foram realizadas revisões de material depositado nos Herbários URM e O, revisões de literatura, coletas em 13 estados abrangendo Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica e confirmação das identificações por comparação de sequências de DNA. Com isso, 465 espécies distribuídas em 166 gêneros estão listadas atualmente para o Brasil. Dentre essas, cinco são reportadas como novas ocorrências para os Neotrópicos, 17 para o Brasil, 20 para o Nordeste, nove para a Amazônia, uma para o Cerrado, 29 para a Caatinga e duas para a Mata Atlântica. As análises das sequências obtidas nos mostraram uma nova combinação em *Phlebiopsis*, uma nova combinação em *Rhizochaete*, uma nova espécie de *Ceraceomyces*, uma de *Corticium*, três novas de *Lyomyces*, uma de *Lopharia*, três de *Trechispora*, uma de *Xylobolus* e cinco novas espécies de *Xylodon*. Os resultados demonstram que, após a adição de sequências de espécimes brasileiros aliada a análises morfológicas, há uma alta e ainda desconhecida diversidade desses organismos nos ecossistemas brasileiros.

Palavras-chave: Basidiomycota, Fungos ressupinados, Macrofungos, Taxonomia

1. Introdução

Pertencentes ao filo Basidiomycota, os fungos corticioides são caracterizados por apresentar basidiomas geralmente ressupinados e com himenóforo liso. Apesar da similaridade macromorfológica entre as espécies, esses organismos são, na maioria dos casos, de origem polifilética (Larsson, 2007). De modo geral, as espécies apresentam-se essencialmente ressupinadas a efuso-reflexas, mas, embora menos constantes, há também as que apresentam basidioma cupulado ou até mesmo estipitado. Apesar da simplicidade dos basidiomas, estes fungos possuem, além das estruturas férteis, uma vasta variedade de microestruturas estéreis no himênio, subhimênio e subículo, tais como asterohifídios, hifídios, gloeocistídios, cistidiolos e leptocistídios.

O conhecimento sobre a relevância dos fungos em ecossistemas florestais permite afirmar que a maior parte dos fungos corticioides, assim como outros Agaricomycetes, está envolvida na degradação da madeira a partir da decomposição de substratos como a celulose ou lignina (Hjortstam *et al.*, 1987; Parmasto *et al.*, 2004; Floudas *et al.*, 2012; Nagy *et al.*, 2016). O aparato enzimático desses organismos, bem como a nutrição peculiar observada nos fungos, está diretamente relacionado à ciclagem de nutrientes nas florestas, atuando ativamente na manutenção dos ecossistemas terrestres (Gilbertson, 1980; Webster e Weber, 2007). Algumas espécies, no entanto, são relatadas como fitopatogênicas (Stalpers e Loerakker, 1981; Larsson, 2007).

São relatadas mais de 1800 espécies para o grupo, distribuídas em aproximadamente 250 gêneros conhecidos, mas grande parte dos trabalhos publicados com enfoque em fungos corticioides é proveniente das regiões temperadas do hemisfério norte (Donk, 1964; Larsson, 2007; Bernicchia e Gorjón, 2010) e pouco se sabe sobre a diversidade e as relações filogenéticas desses fungos provenientes de regiões tropicais. Estudos sobre esse

grupo no Brasil são encontrados nos trabalhos de Hjortstam e Ryvarden (2007), Baltazar e Gibertoni (2009), Drechsler-Santos *et al.* (2009, 2013), Gomes-Silva e Gibertoni (2009), Gibertoni e Drechsler-Santos (2010), Gorjón e De Jesus (2012), Baltazar *et al.* (2013, 2014, 2015, 2016, 2017), Chikowski *et al.* (2016, 2017), Koch *et al.* (2018), Leal-Dutra *et al.* (2018) e Ordynets *et al.* (2018). Esses trabalhos reportam a ocorrência de cerca de 350 espécies destes fungos no país, das quais apenas cinco são registradas em áreas da Caatinga, enquanto as demais são relatadas para o Cerrado, Mata Atlântica e Amazônia. Além disso, alguns desses trabalhos, por meio de sequências de DNA, definiram espécies e gêneros e relações filogenéticas entre táxons.

O pouco conhecimento sobre as espécies neotropicais limita a compreensão global dos processos de distribuição de espécies, bem como posicionamento filogenético de diversos grupos, demonstrando a necessidade de maiores esforços para o estudo desses organismos. Desse modo, o objetivo deste trabalho é divulgar o status da diversidade de fungos corticioides no país, a partir de revisão de herbários URM e O, coletas em áreas da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, bem como a adição de sequências de DNA de espécimes brasileiros às análises filogenéticas.

As coletas foram realizadas no período de 2007 a 2018 em várias áreas do Brasil (Tabela 1). Para a determinação das espécies foram utilizadas literaturas especializadas próprias para cada grupo tais como Hallenberg (1985), Boidin & Lanquetin (1987), Chamuris (1988), Hjortstam & Ryvarden (1990), Larsson (1996), Nakasone (1997) e Núñez & Ryvarden (1997). A nomenclatura seguiu as bases de dados Index Fungorum (www.indexfungorum.org), Mycobank (www.mycobank.org) e artigos mais atuais sobre alguns táxons.

Os estudos de biologia molecular seguiram-se a partir da extração do DNA dos espécimes de interesse de acordo com o protocolo de Goés-Neto *et al.* (2005), amplificação das regiões do DNA ribossomal ITS e LSU (Lima-Júnior *et al.*, 2014) e sequenciamento na Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco. Após obtidas as sequências, as análises filogenéticas foram realizadas em *softwares* específicos, a partir da comparação com sequências de referência depositadas em bancos de dados públicos (*GenBank* e UNITE).

Anteriormente, cerca de 350 espécies de fungos corticioides eram registradas para o Brasil. Após as revisões de literatura, de herbários, das coletas em campo e confirmação das identificações por comparação de sequência de DNA, um total 465 espécies distribuídas em 166 gêneros estão listadas atualmente. Dentre essas, cinco espécies são reportadas como novas ocorrências para os Neotrópicos, 17 para o Brasil, dentre elas *Phlebia ludoviciana* (Burt) Nakasone & Burds., antes só relatada para América do Norte (Nakasone & Burdsall Jr., 1982) (Figura 1), 20 para o Nordeste, nove para a Amazônia, uma para o Cerrado, 29 para a Caatinga e duas para a Mata Atlântica (Chikowski *et al.*, 2019 – submetido).

As análises das sequências obtidas indicaram uma nova combinação em *Rhizochaete* Gresl., Nakasone & Rajchenb.: *R. sulphurosa* (Bres.) Chikowski, K.H. Larss. & Gibertoni (Figura 2) (Chikowski *et al.*, 2016); uma nova espécie de *Ceraceomyces*: *C. atlanticus* Chikowski & K.H. Larss. (Figura 3) (Chikowski *et al.*, 2017); uma nova combinação em *Phlebiopsis* Jülich: *P. amethystea*, antes pertencente a *Hjortstamia* Boidin & Gilles (Figura 4); uma nova espécie de *Corticium* Pers.; uma nova espécie de *Lopharia* Kalchbr. & MacOwan (Figura 4), três novas espécies de *Lyomyces* P. Karst., (Figura 5), três novas espécies de *Trechispora*, uma nova espécie de *Xylobolus* P. Karst. (Figura 6) (Crous *et al.* – no prelo) e cinco novas espécies de *Xylodon* (Pers.) Gray (Figura 5).

A partir dos dados obtidos podemos afirmar que o Brasil apresenta grande diversidade de fungos corticioides, contudo trabalhos futuros em regiões ainda não contempladas são imprescindíveis para ampliar o conhecimento sobre espécies desse grupo. Novas espécies e gêneros foram descobertos e é muito provável que ainda há uma grande diversidade desses organismos a ser explorada.

Embora fundamentais para a delimitação de espécies, os dados morfológicos utilizados na identificação de membros corticioides constituem-se como ferramenta limitada para alguns espécimes, sendo indispensável a utilização de sequências de DNA e de análises filogenéticas.

Nesse âmbito, a região 28S rDNA fornece dados robustos para a delimitação de alguns gêneros, mas não para espécies. O uso das regiões ITS e LSU apresenta uma resolução limitada para a delimitação de novos gêneros, sobretudo em ordens mais amplas, como Hymenochaetales, Polyporales e Russulales. Para incrementar

Tabela 1. Estados, municípios, coordenadas geográficas das áreas de coleta (FLONA=Floresta Nacional, PARNA = Parque Nacional, PE = Parque Estadual, RESEX=Reserva Extrativista, REBIO=Reserva Biológica, RPPN = Reserva Particular do Patrimônio Natural).

Estados	Áreas de coleta	Município	Coordenadas Geográficas
AMAZÔNIA			
Acre	RESEX Cazumbá-Iracema	Sena Madureira	09°28'26"S, 69°27'09"O
	FLONA do Macauã	Sena Madureira	09°48'42"S, 69°29'25"O
	FLONA de São Francisco	Sena Madureira	09°51'42"S, 69°29'25"W
Alagoas	REBIO de Pedra Talhada	Quebrangulo	09°15'32"S, 36°25'12"W
Amapá	FLONA do Amapá	Porto Grande	00°55'34"N, 51°35'45"O
	REBIO Lago Piratuba	Cutias	01°49'06"N, 50°26'51"O
Maranhão	RESEX do Ciriaco	Cidelândia	05°10'27"S, 47°46'54"O
Pará	Estação Científica Ferreira Penna	Melgaço/Portel	01°42'24"S, 51°27'34"O
	FLONA de Caxiuanã	Melgaço	01°47'32"S, 51°26'02"O
	FLONA Saraca-Taquera	Trombetas/Oriximiná	01°20'57"S, 57°15'46"O
	Hydro de Paragominas	Paragominas	03°13'40"S, 47°46'50"O
	Ilha de Cotijuba	Belém	01°13'13"S, 48°32'18"O
	Parque Ambiental de Belém	Belém	01°23'29"S, 48°23'00"O
Rondônia	Base de Selva Guararapes	Porto Velho	08°43'32"S, 63°50'00"O
	FLONA do Jamari	Itapuã do Oeste	09°11'29"S, 63°05'04"O
	Parque Natural Municipal Olavo Pires	Porto Velho	08°41'14"S, 63°52'05"O
	Sítio Primavera	Porto Velho	08°41'34"S, 63°52'05"O
	Sítio do "Seu Careca"	Porto Velho	08°37'32"S, 63°57'49"O
CAATINGA			
Bahia	Serra da Jibóia	Santa Teresinha	12°51'0"S, 39°28'08"O
	-	Curaçá	08°59'34"S, 39°53'60"O
	-	Maracás/Milagres	12°52'14"S, 39°51'4"O
Ceará	PARNA Chapada da Diamantina	Abaíra/Itaerê	13°14'31"S, 41°40'7"O
	FLONA do Araripe/Apodi	Crato	07°21'55"S, 39°26'26"O
	Serra de Ibiapaba	Tianguá	03°52'47"S, 40°57'50"O
Paraíba	RPPN Não me deixes	Quixadá	04°48'14"S, 38°58'07"O
Pernambuco	Reserva Estadual Mata do Pau-Ferro	Areia	06°58'12"S, 35°42'15"O
	PARNA Vale do Catimbau	Buíque	08°24'00"S, 37°09'30"O
Piauí	Sítio Carro Quebrado	Triunfo	07°50'17"S, 38°06'06"O
Rio Grande do Norte	Sítio Santo Antônio	Cabo de Santo Agostinho	08°15'13"S, 35°03'37"O
Rio Grande do Norte	PARNA Serra das Confusões	Caracol	09°7'30"S, 43°48'11"O
Rio Grande do Norte	PARNA da Furna Feia	Apodi	05°3'30"S, 37°30'39"O
CERRADO			
Mato Grosso do Sul	Parque Estadual do Prosa	Campo Grande	20°27'04"S, 54°33'41"O
	RPPN/UFMS	Campo Grande	20°30'28"S, 54°37'02"O
MATA ATLÂNTICA			
Alagoas	REBIO Pedra Talhada	Quebrangulo	09°14'40"S, 36°25'35"O
Paraíba	FLONA da Restinga de Cabedelo	Cabedelo	07°00'46"S, 30°50'40"O
	REBIO Guaribas	Mamanguape	06°43'12"S, 35°10'55"O
Pernambuco	7 GAC	Olinda	08°00'03"S, 34°51'42"O
	Campus da UFPE	Recife	08°03'59"S, 34°56'64"O
	Mata do Estado	Caruaru	07°35'27"S, 35°29'27"O
	Jardim Botânico do Recife	Recife	08°04'41"S, 34°57'35"O
	PE Dois Irmãos	Recife	08°00'26"S, 35°56'49"O
	PE João de Vasconcelos Sobrinho	Caruaru	08°22'10"S, 36°01'40"O
	Refúgio Ecológico Charles Darwin	Igarassu	07°49'42"S, 34°52'29"O
	REBIO de Salinho	Tamandaré	08°44'13"S, 35°10'11"O
	RPPN Frei Caneca	Jaqueira	08°42'41"S, 35°50'30"O
	Serra do Contente	Gravatá	08°12'40"S, 35°34'04"O
Rio Grande do Norte	PE Dunas do Natal	Natal	05°48'42"S, 35°11'32"O
Sergipe	RPPN Mata da Estrela	Baía Formosa	06°22'10"S, 35°00'28"O
Sergipe	PARNA Serra de Itabaiana	Areia Branca	10°48'22"S, 37°22'29"O

Fonte: Lira (2016), Chikowski (2019).

a confiabilidade das análises, é necessário o uso de mais marcadores, tais como os do *barcode* secundário (*rpb1*, *rpb2* e *tef1*) para elucidar o posicionamento e a identificação dos gêneros dentro das famílias às quais pertencem (Floudas & Hibbett 2015, Vellinga *et al* 2016).

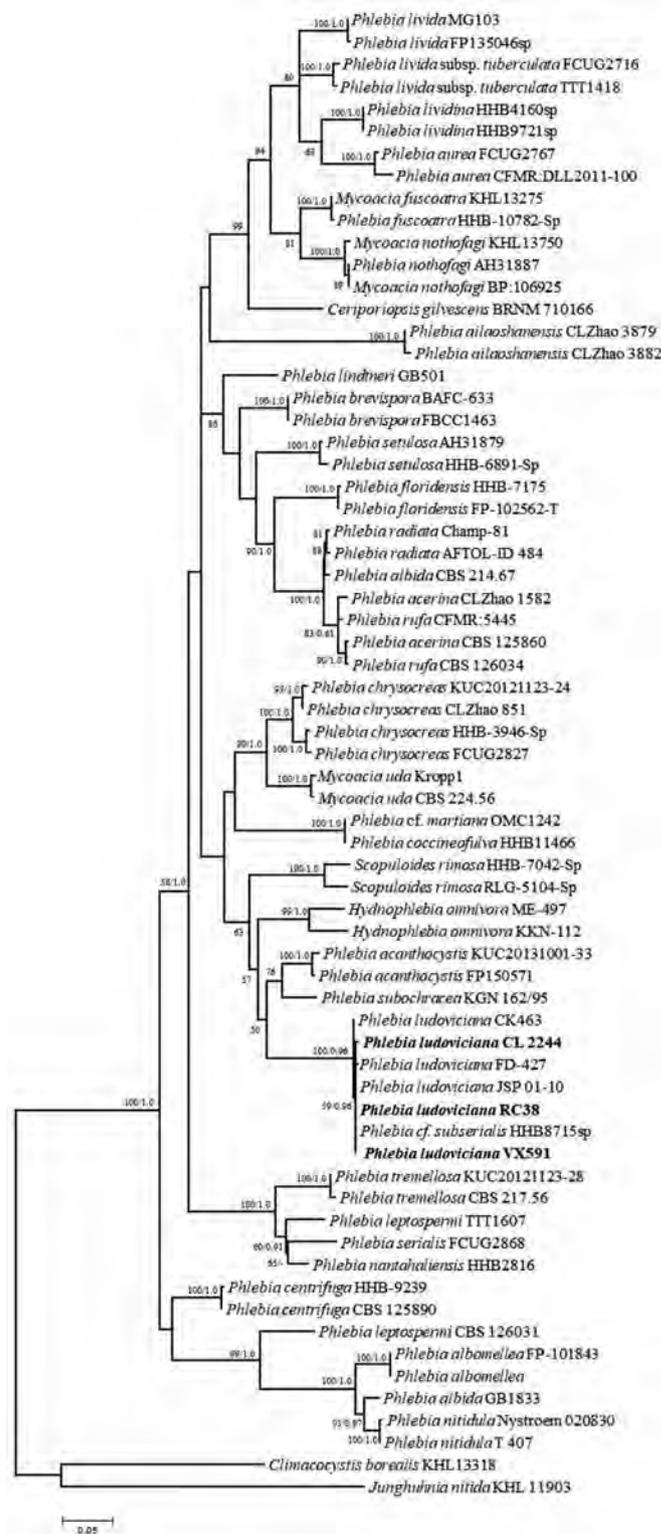


Figura 1. Reconstrução filogenética de espécies em Meruliaceae baseada em análises combinadas das regiões ITS e LSU do rDNA, demonstrando a ocorrência de espécimes *Phlebia ludoviciana* no Brasil.

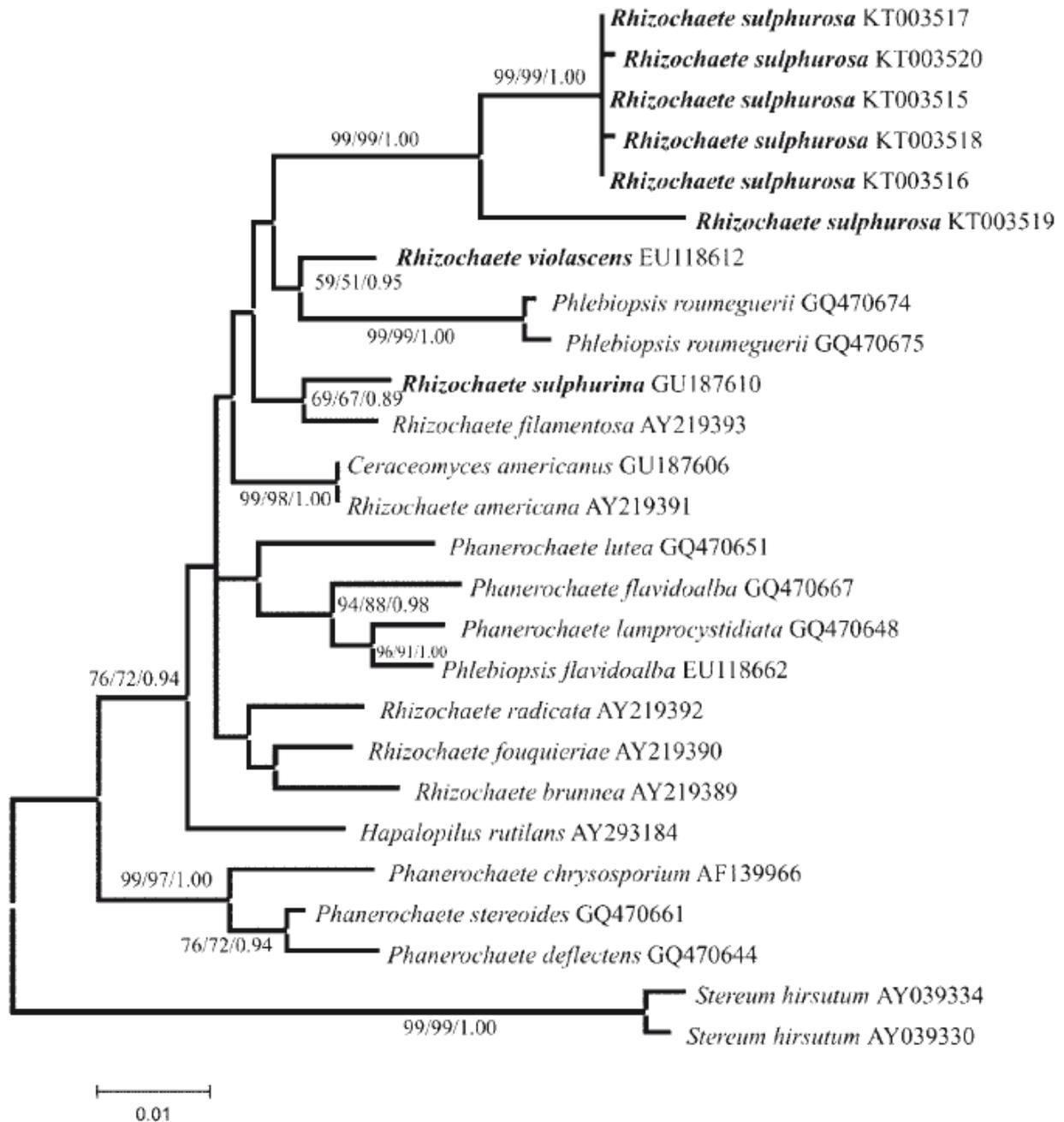


Figura 2. Reconstrução filogenética de fungos corticioides baseada em sequências da região LSU, demonstrando o posicionamento de *R. sulphurosa* no gênero correspondente (Chikowski *et al.*, 2016).

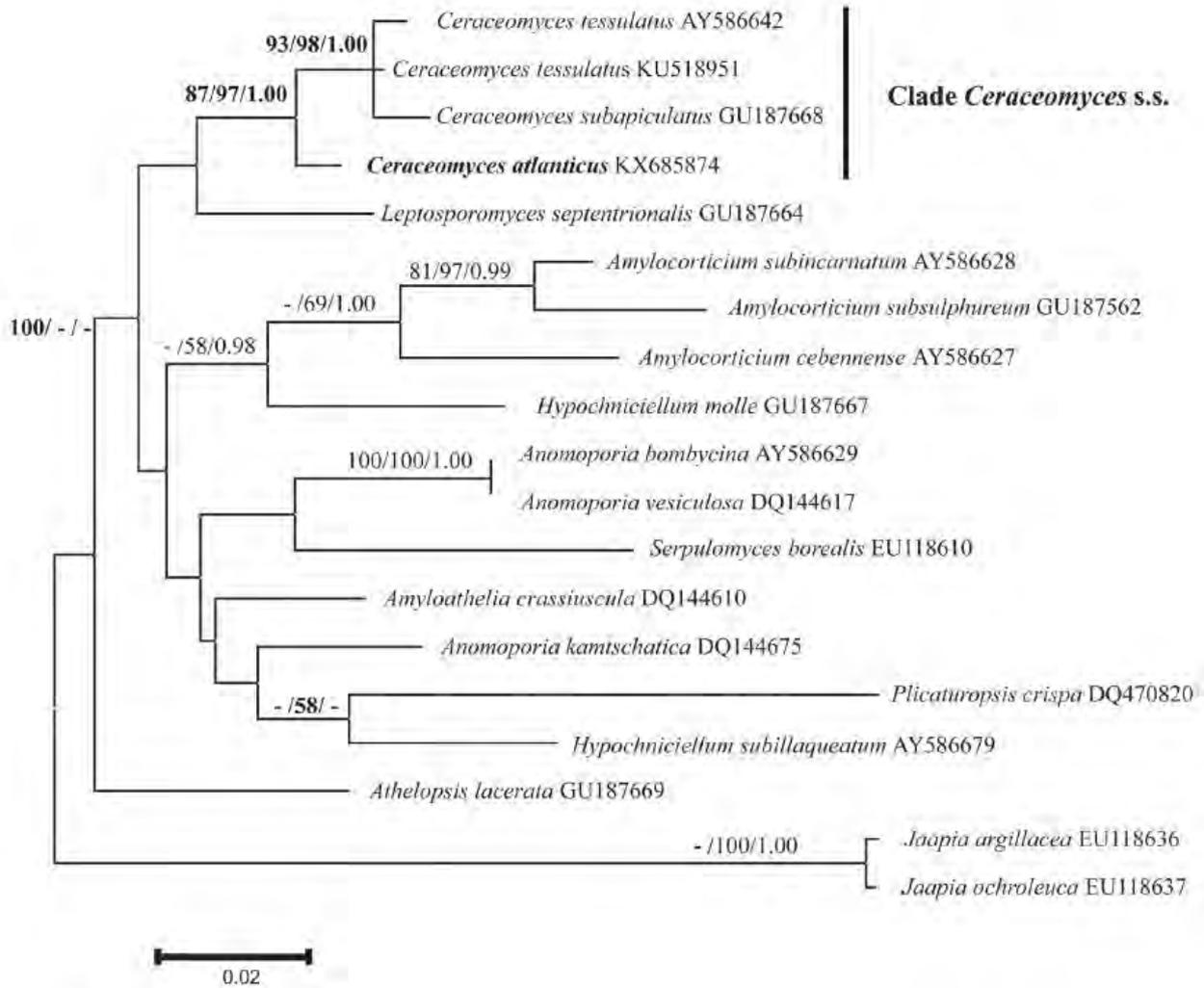


Figura 3. Reconstrução filogenética baseada em sequências da região LSU, demonstrando o posicionamento de *Ceraceomyces atlanticus* no clado de *Ceraceomyces* s.s. (Chikowski et al., 2017).

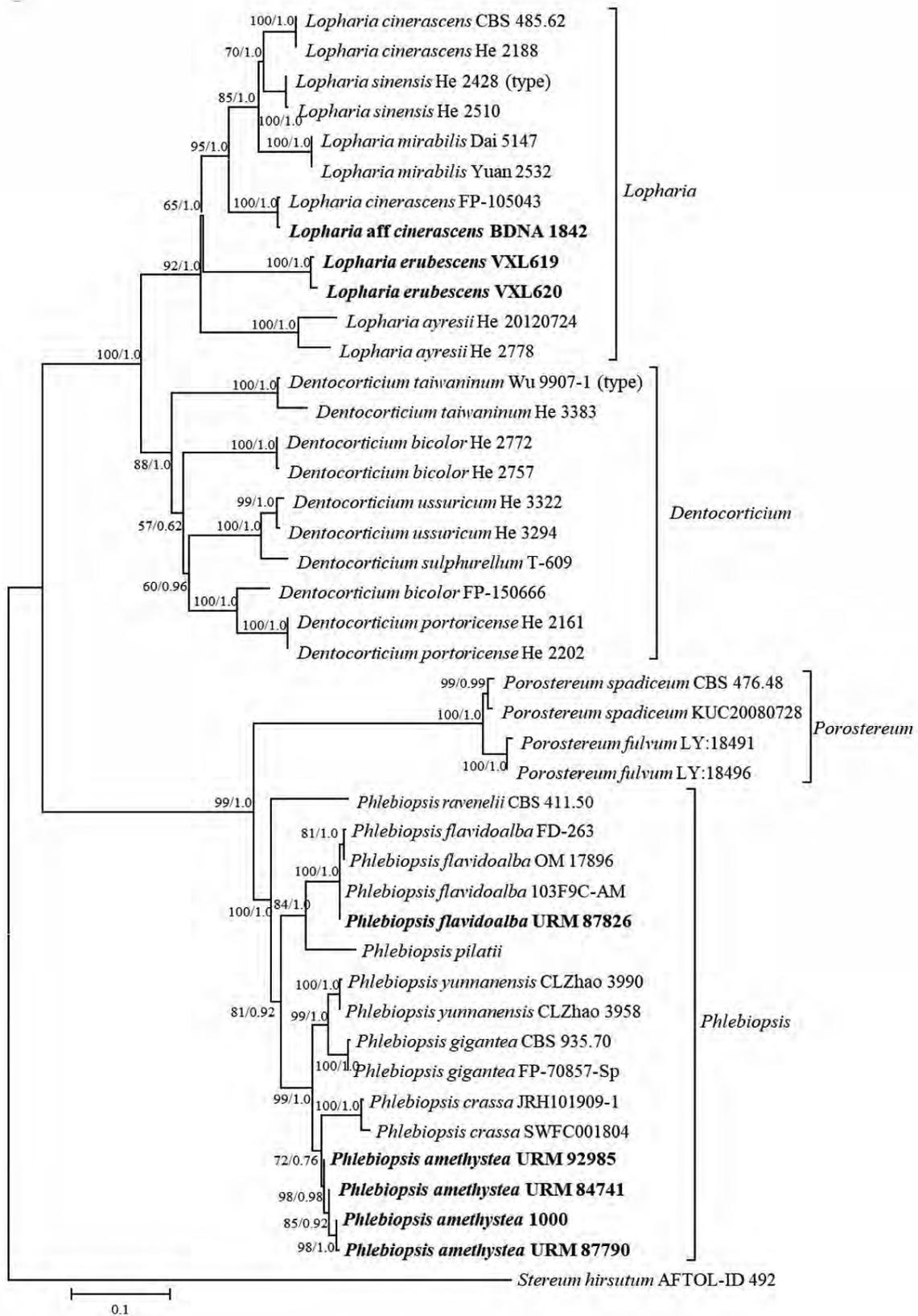


Figura 4. Reconstrução filogenética de *Dentocorticium*, *Lopharia*, *Phlebiopsis* e *Porostereum* baseada na análise combinada das regiões ITS e LSU do rDNA, demonstrando o posicionamento da nova espécie de *Lopharia* e a nova combinação *Phlebiopsis amethystea* como uma nova espécie no gênero.

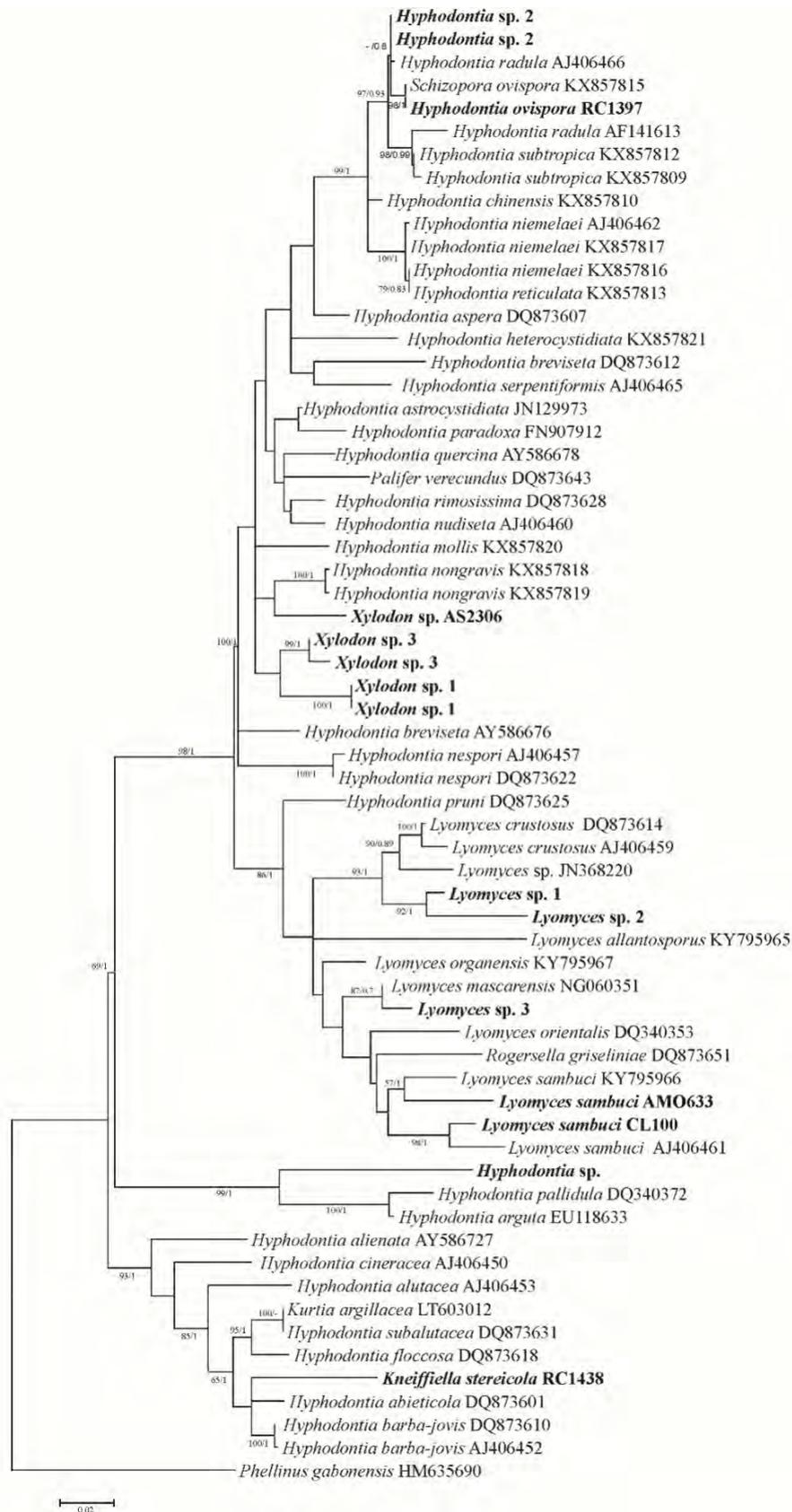


Figura 5. Reconstrução filogenética de Schizoporaceae (Hymenochaetales) baseada em seqüências da região LSU, demonstrando o posicionamento das prováveis espécies novas de *Lyomyces* e *Xylodon*.

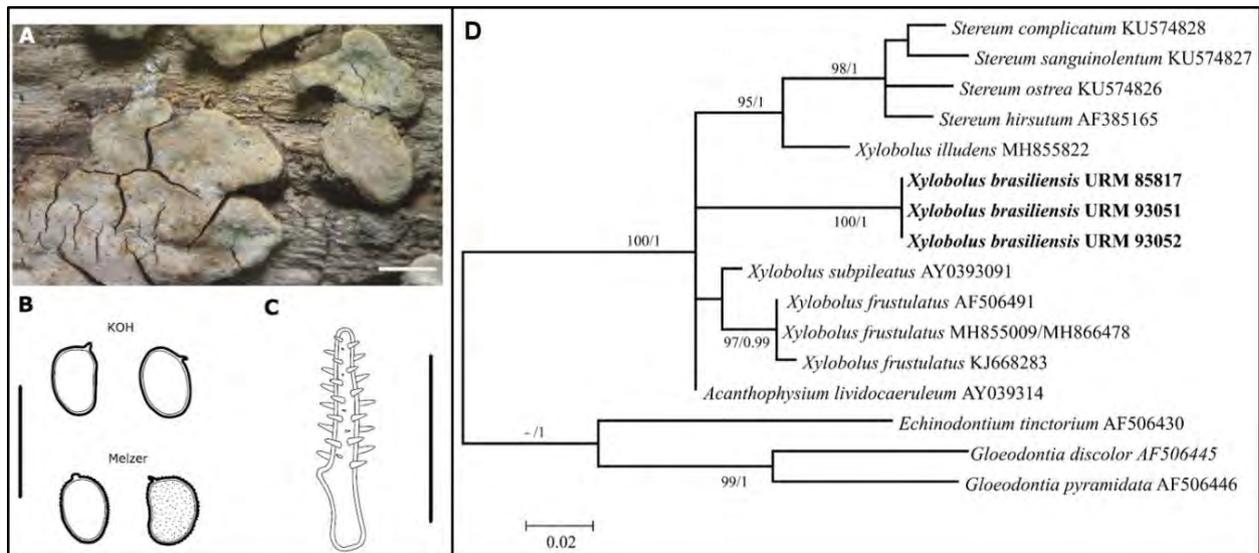


Figura 6. *Xylobolus brasiliensis*. A – Basidioma (espécime tipo), B – Basidiosporos, C – Acanthohifídios, D – Reconstrução filogenética baseada na análise combinada das regiões ITS e LSU do rDNA, demonstrando o posicionamento de *X. brasiliensis* como uma nova espécie no gênero. Escalas: A = 1 mm, B = 5 μ m e C = 30 μ m.

2. Referências

- Baltazar J.M., Gibertoni T.B. 2009. A checklist of the aphylloroid fungi (Basidiomycota) recorded from the Brazilian Atlantic Forest. *Mycotaxon* 109: 439–442.
- Baltazar J.M., Silveira R.M.B., Rajchenberg M. 2013. *Asterostromella roseola* Bres. ex Rick is combined in *Dendrocorticium* (Corticaceae, Agaricomycetes). *Phytotaxa* 104: 49-52.
- Baltazar J.M., Pildain M.B., Gorjón S.P., Silveira R.M.B., Rajchenberg M. 2014. Phylogenetic relationships of *Hydnum peroxydatum* support the synonymy of *Hydnochaete* with *Hymenochaete* (Hymenochaetaeae, Agaricomycetes). *Mycologia* 106: 323-327.
- Baltazar J.M., Gorjón S.P., Pildain M.B., Rajchenberg M., Da Silveira R.M.B. 2015. *Acanthocorticium brueggemannii*, a new corticioid genus and species related to cyphelloid fungi in the euagarics clade (Agaricales, Basidiomycota). *Botany* 93: 453-463.
- Baltazar J.M., Silveira R.M.B., Rajchenberg M. 2016. Type studies of J. Rick's corticioid homobasidiomycetes (Agaricomycetes, Basidiomycota) housed in the Herbarium Anchieta (PACA). *Phytotaxa* 255: 101-13.
- Baltazar J.M., Trierveiler-Pereira L., Silveira R.M.B.; Loguercio-Leite, C. 2017. Santa Catarina Island mangroves 5: Corticioid fungi and an updated checklist of xylophilous fungi and pseudofungi. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 144: 230-238.
- Bernicchia A., Gorjón S.P. 2010. *Fungi Europaei 12 - Corticiaceae* s.l. Edizioni Candusso, Italy.
- Boidin J., Lanquetin P. 1987. Le genre *Scytinostroma* Donk (Basidiomycètes, Lachnocladiaceae). *Bibliotheca Mycologica* 114.
- Chamuris G. 1988. The non-stipitate stereoid fungi in the northeastern United States and adjacent Canada. *Mycol. Mem.* No. 14. J. Cramer, Stuttgart.
- Chikowski R.S., Larsson K-H., Gibertoni T.B. 2016. Three new combinations in *Rhizochaete* (Agaricomycetes, Fungi) and a new record to the Brazilian Amazonia. *Nova Hedwigia* 102: 185-196.
- Chikowski R.S. Larsson K.H., Gibertoni T.B. 2017. *Ceraceomyces atlanticus* (Amylocorticiales, Basidiomycota), a new species from the Atlantic Rain Forest, Brazil. *Phytotaxa* (Online) 296 (1): 73-80.
- Donk M.A. 1964. A conspectus of the Aphyllorales. *Persoonia* 3: 199-324.

- Drechsler-Santos E.R., Gibertoni T.B., Góes-Neto A., Cavalcanti M.A.Q. 2009. A re-evaluation of the lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian semi-arid region. *Mycotaxon* 108: 241-244.
- Drechsler-Santos E.R., Ryvarden L., Bezerra J., Gibertoni T.B., Salvador-Montoya C.A., Cavalcanti M.A.Q. 2013. New Records of Auriculariales, Hymenochaetales and Polyporales (Fungi, Agaricomycetes) for the Caatinga Biome. *Check List* (São Paulo. Online) 9: 800-805.
- Floudas D. *et al.* 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336: 1715–1719.
- Gibertoni T.B., Drechsler-Santos E.R. 2010. Lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian Cerrado biome. *Mycotaxon* 111: 87–9.
- Gilbertson R.L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia* 72(1): 1-49.
- Goés-Neto A., Loguercio-Leite C., Guerrero R.T. 2005. DNA extraction from frozen Field collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB based methods. *Biotemas* 18 (2): 19-32.
- Gorjon S.P., De Jesus M.A. 2012. Some new species and new records of corticioid fungi (Basidiomycota) from the Brazilian Amazon. *Phytotaxa* (Online) 67: 38-54.
- Gomes-Silva A.C., Gibertoni T.B. 2009. Checklist of the aphyllporaceous fungi (Agaricomycetes) of the Brazilian Amazonia. *Mycotaxon* 108: 319–32.
- Hallenberg N. 1985. *The Lachnocladiaceae and Coniophoraceae of North Europe*. Oslo: Fungiflora, 96 pp.
- Hjortstam K., Larsson K-H., Ryvarden L. 1987. The Corticiaceae of North Europe. *Synopsis Fungorum* 1.
- Hjortstam K., Ryvarden L. 1990. *Lopharia* and *Porostereum* (Basidiomycotina). *Synopsis Fungorum* 4. Oslo: Fungiflora.
- Hjortstam K., Ryvarden L. 2007. Checklist of corticioid fungi (Basidiomycotina) from the tropics, subtropics and the southern hemisphere. *Synopsis Fungorum* 22: 27–146.
- Koch R.A., Lodge D.J., Sourell S., Nakasone K., McCoy A.G., Aime M.C. 2018. Tying up loose threads: revised taxonomy and phylogeny of an avian-dispersed Neotropical rhizomorph-forming fungus. *Mycological Progress* 17(9): 989–998.
- Larsson K.H. 1996. New species and combinations in *Trechispora* (Corticiaceae, Basidiomycotina). *Nordic Journal of Botany* 16 (1): 83–98.
- Larsson K.H. 2007. Re-thinking the classification of corticioid fungi. *Mycological Research*: 1040 – 1063.
- Leal-Dutra C.A. *et al.* 2018. Reclassification of *Parapterulicium* Corner (Pterulaceae, Agaricales), contributions to Lachnocladiaceae and Peniophoraceae (Russulales) and introduction of *Baltazaria* gen. nov. *MycKeys* 37: 39–56.
- Lima-Júnior N.C., Gibertoni T.B., Malosso E. 2014. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. *Rev Biol Trop* 62 (3): 1197-208.
- Nagy L.G. *et al.* (2016) Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. *Molecular Biology and Evolution* 33: 959–970.
- Nakasone K.K. 1997. Studies in *Phlebia*. Six species with teeth. *Sydowia* 49 (1):49–79.
- Núñez M., Ryvarden L. 1997. The genus *Aleurodiscus* (Basidiomycotina). *Synopsis Fungorum* 12:27–146.
- Ordynets A., Scherfl D., Pansegrau F., Denecke J., Lysenko L., Larsson K.H., Langer E. 2018. Short-spored Subulicystidium (Trechisporales, Basidiomycota): high morphological diversity and only partly clear species boundaries. *MycKeys* 35: 41–99.
- Parmasto E., Henrik-Nilsson R., Larsson K-H. 2004. Cortbase version 2 – extensive updates of a nomenclatural database for corticioid fungi (Hymenomycetes). *PhyloInformatics* 5:1-7.
- Stalpers J.A., Loerakker W.M. 1982. *Laetisaria* and *Limonomyces* species (Corticiaceae) causing Pink diseases in turf grasses. *Canadian Journal of Botany* 60: 529-537.
- Webster J., Weber R. 2007. *Introduction to Fungi*. 3 edition, Cambridge University Press, Cambridge, 841p.

Diversidade de fungos cifeloides no Brasil

TRIERVEILER-PEREIRA, Larissa^{1,2}; THORN, Greg³; GUGLIOTTA, Adriana de Mello¹

¹ Instituto de Botânica, São Paulo, SP

² FATEC de Itapetininga, SP

³ University of Western Ontario, London, Canadá

Emails: lt_pereira@yahoo.com.br, rgthorn@uwo.ca, agugliotta@ibot.sp.gov.br

Resumo

Os fungos cifeloides correspondem à homobasidiomicetos relacionados ao conceito morfológico tradicional do gênero *Cyphella* e no passado, estiveram agrupados na família polifilética Cyphellaceae. Atualmente, cerca de 120 espécies distribuídas em 40 gêneros são conhecidas e aceitas. As espécies cifeloides podem produzir basidiomas com diferentes morfologias, como por exemplo: discoide, tubuliforme, cupuliforme ou globoso. O himenóforo é geralmente liso e os basidiomas crescem sobre matéria vegetal em decomposição. O objetivo desse trabalho é apresentar o atual estado de conhecimento da diversidade de fungos cifeloides que ocorrem no Brasil, apresentando uma lista de espécies e comentários sobre sua distribuição, além de discutir espécies duvidosas e excluídas. No total, são registradas para o país, 48 espécies distribuídas em 23 gêneros. O Rio Grande do Sul é o estado com maior número de espécies citadas, especialmente devido aos estudos de J. Rick. Entretanto, novas coletas são necessárias principalmente para confirmar a ocorrência de táxons duvidosos registrados na literatura. O Brasil é um país megadiverso e provavelmente novos táxons serão descobertos como resultado de novos inventários.

Palavras-chave: *Cyphella*, Cyphellaceae *s.l.*, Micota Neotropical, Taxonomia de fungos

1. Introdução

É de conhecimento entre os micólogos que o número de espécies fúngicas descritas atualmente (cerca de 144.000 spp.) corresponde apenas à uma pequena porção da diversidade real do Reino Fungi, cuja estimativa de espécies é de 5 a 6 milhões (Blackwell, 2011; Taylor *et al.*, 2014; Cannon *et al.*, 2018). Ainda, algumas espécies de fungos, especialmente aquelas que produzem grandes basidiomas ou que são de interesse comercial (ex. espécies utilizadas na medicina ou na alimentação), são melhor conhecidas que outras espécies inconspícuas.

Os fungos cifeloides correspondem a um desses grupos de fungos cujo estudo vem sendo negligenciado por muitos micólogos. Apesar de serem classificados como macrofungos, muitas espécies produzem basidiomas tão diminutos (com menos de 0,5 mm de diâmetro) que os espécimes só são encontrados em campo devido ao hábito gregário dos basidiomas.

A maioria das espécies de fungos cifeloides produz basidiomas muito similares aos discomicetos (um dos tipos de ascoma dos ascomicetos), já que os basidiomas são cupuliformes a discoides e com himenóforo liso (Donk, 1966).

A primeira espécie de fungo cifeloides descrita para o Brasil foi *Cyphella puiggarii* Speg. [atualmente *Calyprella puiggarii* (Speg.) W.B. Cooke (Cooke, 1961)], descrita por Carlos Spegazzini baseando-se em um espécime coletado em 1888 por Juan Ignacio Puiggari em Apiaí, SP (Spegazzini, 1889).

Ainda no século XIX, três espécies brasileiras foram descritas por Hennings: *Cyphella punctoidea* Henn. [atualmente *Seticyphella punctoidea* (Henn.) Agerer] de Blumenau, SC (Hennings, 1897); *Cyphella bakeriana* Henn. [= *Calyprella bakeriana* (Henn.) W.B. Cooke] e *Cyphella paraensis* Henn. [= *Nochascypha paraensis* (Henn.) Bodensteiner] de Belém, PA (Hennings, 1908). *Cyphella subceracea* Henn., também descrita em Hennings (1897), corresponde a uma espécie de *Favolaschia* (Donk, 1959).

Adicionalmente, novas espécies cifeloides foram descritas para o Sul do Brasil por J. Rick no início e meados do século XX (Rick, 1906, 1931, 1959, 1960); e para o Norte do Brasil por Singer (1989) e Gorjón e Jesus

(2014). Ainda, há registros de espécies de fungos cifeloides para o país nos trabalhos de Viégas (1945), Meijer (2006), Putzke (1994, 2002), Albuquerque *et al.* (2007), Sulzbacher *et al.* (2008, 2009), e outros.

Com o intuito de apresentar a situação atual do conhecimento de fungos cifeloides no Brasil, um levantamento bibliográfico foi realizado e as espécies citadas para o país são apresentadas. Ainda, são apresentados resultados oriundos de nossos estudos com espécimes de fungos cifeloides depositados no Herbário PACA, onde muitas coleções e tipos de J. Rick ainda não haviam sido revisados.

2. Taxonomia de fungos cifeloides

Os fungos chamados de cifeloides correspondem a um grupo morfológico de homobasidiomicetos (basidiomicetos que não possuem o basídio septado) de origem polifilética com aproximadamente 120 espécies. Estão relacionados ao conceito morfológico tradicional do gênero *Cyphella* Fr., e no passado estiveram agrupados na família *Cyphellaceae* Lotsy (Donk, 1959; Cooke, 1961; Reid, 1964; Agerer, 1983; Singer, 1986; Bodensteiner *et al.*, 2004).

Inicialmente, foram agrupados em três gêneros: *Cyphella* Fr., *Solenia* Pers. e *Porothelium* Fr. (Cooke, 1961), porém, atualmente mais de 40 gêneros de fungos cifeloides são reconhecidos (Bodensteiner *et al.*, 2007).

De acordo com dados moleculares apresentados por Bodensteiner *et al.* (2004), os fungos cifeloides são formas reduzidas de espécies agaricoides ancestrais, e possuem de 10 a 12 origens independentes dentro do clado dos eu-agaricos (Agaricales). Muitos gêneros ainda não foram incluídos em famílias (*incertae sedis*).

A espécie tipo de *Cyphella*, *C. digitalis* (Alb. & Schwein.) Fr., foi originalmente descrita como *Peziza digitalis* Alb. & Schwein, o que demonstra a proximidade morfológica desses basidiomas com discomicetos. Donk (1966) diz que os fungos cifeloides podem ser caracterizados como discomicetos com basídios. Uma diferença que pode ser notada no campo é que os ascas dos discomicetos estão virados para cima, enquanto os basidiomas dos fungos cifeloides estão virados para baixo, devido às diferentes estratégias de liberação de esporos dos ascos e basídios.

As espécies de fungos cifeloides produzem basidiomas muito pequenos, geralmente com poucos milímetros (Fig. 1), podendo apresentar diferentes morfologias, como por exemplo: discoide, tubuliforme, cupuliforme ou globosa.

Os basidiomas apresentam himenóforo geralmente liso ou com veias, e externamente são formados por hifas especializadas (Fig. 2), que segundo Agerer (1986), corresponde à característica morfológica mais importante para a circunscrição dos gêneros.

Os basidiomas se desenvolvem principalmente sobre matéria orgânica vegetal morta: grama, folhas, galhos e outros pequenos substratos. Apesar do tamanho diminuto, os basidiomas são encontrados em campo porque possuem o hábito gregário.

3. Diversidade de fungos cifeloides no Brasil

Uma lista de espécies de fungos cifeloides citados para o Brasil foi compilada baseada numa investigação intensa de literatura, incluindo estudos publicados por brasileiros e estrangeiros. No total, são 48 espécies, distribuídas em 23 gêneros (Tabela 1).

O estado do Rio Grande do Sul é o que possui o maior número de espécies registradas, principalmente devido aos estudos de J. Rick, que coletou e identificou espécies no início e meados do século XX (Trierveiler-Pereira *et al.*, 2019a). Ainda, foram adicionados os resultados oriundos dos nossos estudos com espécimes cifeloides preservados no Herbário PACA (Trierveiler-Pereira *et al.*, 2019a, b).

Os gêneros de fungos considerados cifeloides são aqueles apresentados por Bodensteiner (2006), com a adição do gênero de heterobasidiomiceto *Heteroscypha* (Agerer e Oberwinkler, 1979). Essa lista apenas inclui registros de espécies identificadas até nível específico. Na coluna 'Observação', foi incluído o nome do basionímo ou sinônimo quando esse foi o nome citado na publicação. A nomenclatura e nomes de autores estão de acordo com base de dados Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

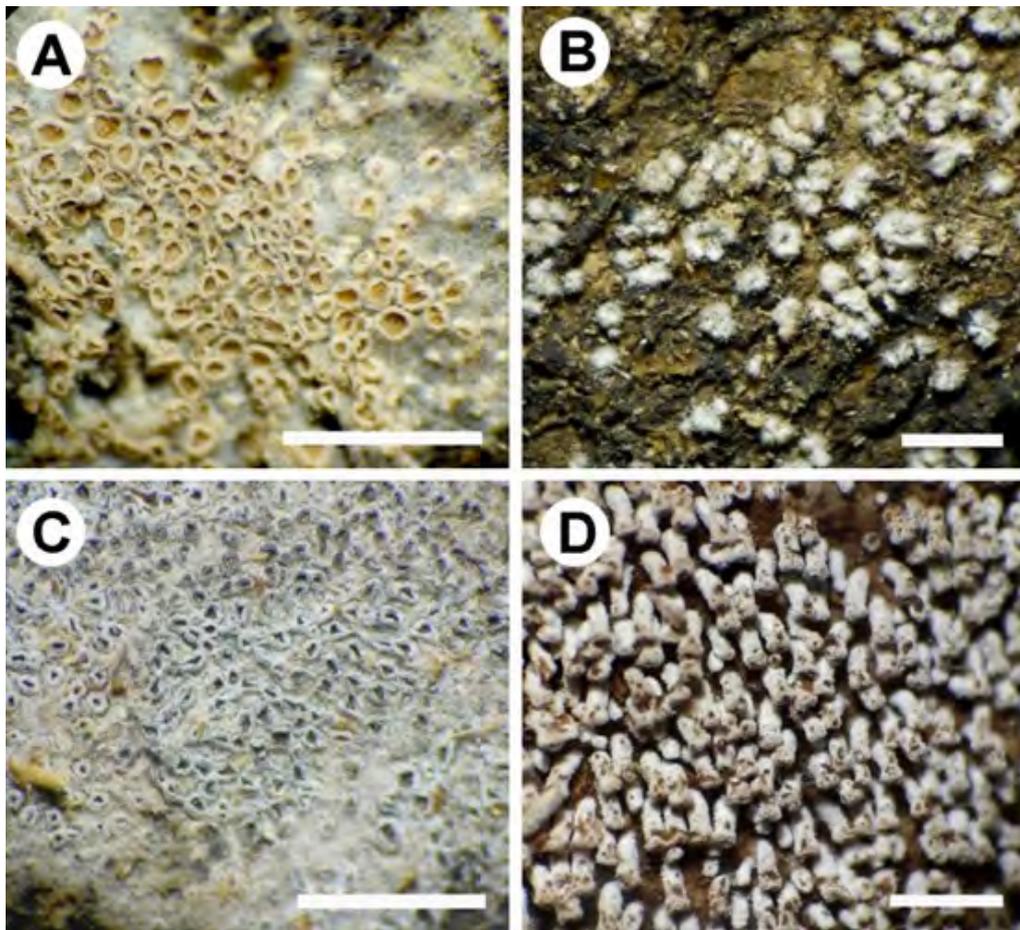


Figura 1. Exemplos de fungos cífeloides. **A:** *Resupinatus* sp. 1; **B:** *Lachnella subfalcispora*; **C:** *Resupinatus* sp. 2; **D:** *Phaeosolenia platensis*. Escala = 2mm.

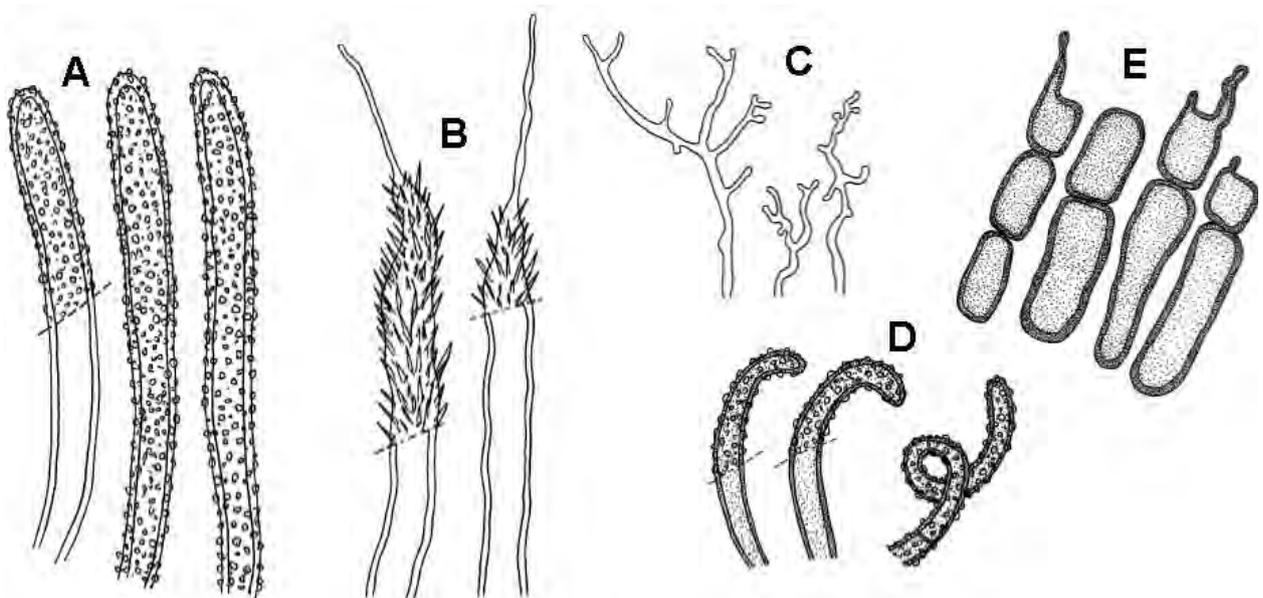


Figura 2. Exemplos de diferentes tipos de hifas que podem formar a superfície externa dos basidiomas dos fungos cífeloides. **A:** hifas com cristais arredondados; **B:** hifas com cristais aciculares e ápice flageliforme; **C:** dendrohifídios; **D:** hifas pigmentadas com ápice curvado ou espiralado; **E:** elementos hifais retangulares a cuboides.

Tabela 1. Espécies de fungos cifeloides citados para o Brasil.

Espécie	Localidade	Referência	Observação
<i>Aleurodiscus hakgallae</i> (Berk. & Br.) Donk	RS	Donk (1959)	
<i>A. mirabilis</i> (Berk. & M.A. Curtis) Höhn	PR	Meijer (2006)	
<i>Aphyllotus campanelliformis</i> Singer	RS	Putzke (2002)	
<i>Arrhenia retiruga</i> (Bull.) Redhead	PR	Meijer (2006)	
<i>Calathella columbiana</i> Agerer	SC	Sulzbacher <i>et al.</i> (2008)	
<i>Calyptella australis</i> (Speg.) W.B. Cooke	BR	Cooke (1961)	<i>Cyphella australis</i> Speg.
<i>C. bakeriana</i> (Henn.) W.B. Cooke	PA	Cooke (1961)	<i>Cyphella bakeriana</i> Henn.
<i>C. cf. flava</i> Singer	PR	Meijer (2006)	
<i>C. cf. pteridophytorum</i> Singer	PR	Meijer (2006)	
<i>C. puiggarii</i> (Speg.) W.B. Cooke	SP	Cooke (1961)	<i>Cyphella puiggarii</i> Speg.
<i>Cellypha goldbachii</i> (Weinm.) Donk	PR	Meijer (2006)	
<i>Chromocyphella muscicola</i> (Fr.) Donk	MG	Albuquerque <i>et al.</i> (2007)	
<i>Cyphella congregatissima</i> Rick	RS	Rick (1959); Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019a)	precisa ser combinada para <i>Seticyphella</i>
<i>Flagelloscypha malmei</i> W.B. Cooke	RS	Cooke (1961); Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019b)	fragmobasidiomiceto
<i>Glabrocyphella</i> sp.	RS	Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019b)	possível espécie nova
<i>G. epileucina</i> (Sacc.) W.B. Cooke	BR	Cooke (1961)	<i>Cyphella epileucina</i> Sacc.
<i>G. palmarum</i> (Berk. & M.A. Curtis) W.B. Cooke	RS	Rick (1959)	<i>Cyphella palmarum</i> Berk. & M.A. Curtis
<i>G. rubescens</i> W.B. Cooke	RS	Cooke (1961)	
<i>Henningsomyces candidus</i> (Pers.) Kuntze	BR	Rick (1960); Cooke (1961)	<i>Solenia candida</i> Pers.
<i>H. minimus</i> (Cooke & W. Phillips) Kuntze	RS	Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019a)	<i>Solenia minima</i> Rick
<i>Lachnella alboviolasces</i> (Alb. & Schwein.) Fr.	BR	Cooke (1961)	
<i>L. subfalcispora</i> D.A. Reid	RS	Rick (1959); Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019a)	<i>Cyphella grisea</i> Rick
<i>L. villosa</i> (Pers.) Donk	SP	Viégas (1945)	citado como <i>Cyphella villosa</i> (Pers.) P. Crouan & H. Crouan
<i>Maireina crispula</i> Rick	RS	Cooke (1961)	Pertence ao gênero <i>Phaeodepas</i> D.A. Reid (Bodensteiner, 2006)
<i>M. regnelliana</i> W.B. Cooke	RS	Cooke (1961); Bodensteiner (2006)	
<i>Merismodes ochracea</i> (Hoffm.) D.A. Reid	BR	Cooke (1961); Reid (1964)	citado como <i>Phaeocyphellopsis ochracea</i> (Hoffm.) W.B. Cooke
<i>Nochascypha paraensis</i> (Henn.) Bodensteiner	PA	Bodensteiner & Agerer (2003)	<i>Cyphella paraensis</i> Henn.; <i>Maireina paraensis</i> (Henn.) W.B. Cooke
<i>Phaeosolenia platensis</i> Speg.	RS, SP	Rick (1960); Sulzbacher <i>et al.</i> (2009)	Bononi <i>et al.</i> (1981) cita como <i>P. densa</i> (Berk.) W.B. Cooke; Rick (1960) como <i>Solenia endophila</i> (Ces.) Fr.
<i>Porotheum cinereum</i> Pat.	RS	Rick (1960); McDonald (2015)	
<i>P. cubense</i> Berk. & M.A. Curtis	RS	Rick (1960); Cooke (1957)	
<i>P. griseum</i> (Rick) Rick	RS	Rick (1960); Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019a)	precisa ser combinada para <i>Resupinatus</i>
<i>P. fimbriatum</i> (Pers.) Fr.	BR, RS	Cooke (1957); Rick (1960)	Rick (1960) cita como <i>Porotheum friesii</i> Mont., que é sinônimo (Cooke, 1957)
<i>Porotheum leucobombycinum</i> W.B. Cooke	RS	Cooke (1957)	
<i>Rectipilus natalensis</i> (Cooke) Agerer	RS	Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019b)	
<i>R. stromatoides</i> Gorjón	AM	Gorjón & Jesus (2014)	
<i>Resupinatus hyalinus</i> (Singer) Thorn, Moncalvo & Redhead	AM	Singer (1989); Thorn <i>et al.</i> (2005)	<i>Stigmatolemma hyalinum</i> Singer
<i>R. poriaeformis</i> (Pers.) Thorn, Moncalvo & Redhead	RS, PE	Cooke (1957); Rick (1960); Thorn <i>et al.</i> (2005); Nogueira-Melo <i>et al.</i> (2011)	<i>Porotheum poriaeforme</i> (Pers.) W.B. Cooke; = <i>P. incanum</i> Kalchbr. de acordo com Cooke (1957)
<i>R. stictoides</i> (Speg.) Nakasone	SP	Donk (1959); Rick (1959); McDonald (2015)	<i>Cyphella stictoides</i> Speg.; <i>Corticium wettsteinii</i> (Bres.) Sacc. & Trotter
<i>R. subrhacodium</i> Singer	RS	Putzke (1994)	
<i>R. trichotis</i> (Pers.) Singer	BR	McDonald (2015)	

Tabela 1. Continuação.

Espécie	Localidade	Referência	Observação
<i>Rimbachia paradoxa</i> Pat.	AM	Putzke (1994)	
<i>Seticyphella punctoidea</i> (Henn.) Agerer	SC	Rick (1959); Cooke (1961); Agerer (1983)	<i>Cyphella punctoidea</i> Henn <i>Flagelloscypha punctoidea</i> (Henn.) W.B. Cooke
<i>Solenia pezizoidea</i> Rick	RS	Rick (1960); Trierveiler-Pereira <i>et al.</i> (2019a)	precisa ser combinada para <i>Maireina</i>
<i>S. porioides</i> (Alb. & Schwein.) Sacc.	RS	Rick (1960)	posicionamento genérico precisa ser elucidado
<i>S. rickiana</i> W.B. Cooke	RS	Cooke (1961)	posicionamento genérico precisa ser elucidado
<i>S. subfasciculata</i> Henn. & E. Nyman	RS	Rick (1960)	posicionamento genérico precisa ser elucidado
<i>S. subnivea</i> W.B. Cooke	BR	Corner (1961)	posicionamento genérico precisa ser elucidado
<i>Wiesnerina horrida</i> Höhn	SP	Corner (1961)	

Os nomes dos estados brasileiros estão abreviados de acordo com as siglas: RS – Rio Grande do Sul, SC – Santa Catarina, PR – Paraná, SP – São Paulo, MG – Minas Gerais, PA – Pará, AM – Amazonas. Quando na literatura o estado brasileiro não foi citado, a localidade foi definida como BR (Brasil).

4. Registros duvidosos e espécies excluídas

- *Arrhenia cupuliformis* P. Henn., citada para São Leopoldo, RS (Putzke, 1994): espécie não foi considerada por Redhead (1984) no seu estudo sobre o gênero *Arrhenia*;
- *Cyphella aeruginascens* P. Karst., coletada no RJ: de acordo com Cooke (1961), a espécie é provavelmente sinônima do líquen *Lecidea irregularis* Fée;
- *Cyphella subgrisella* Rick, descrita para o RS (Rick, 1959): nenhuma exsicata registrada como *Cyphella subgrisella* foi encontrada na coleção de Rick no PACA;
- *Cyphella tijucensis* Henn., citada por Rick (1959): exsicata encontrada no PACA (12864) é indeterminável;
- *Lachnella alboflavida* Bres., citada para o Brasil por Cooke (1961): de acordo com Agerer (1979) corresponde a *Chaetocalathus liliputianus* (Mont.) Singer;
- *Porotheleum rugosum* Berk., citada para Panuré, AM (Cooke, 1957): de acordo com Donk (1959, p.60), é um fungo poliporoide;
- *Resupinatus bicolor* (Mont.) Singer, citada para Panuré, AM (Putzke, 1994): de acordo com Thorn e Barron (1986) é sinônimo de *Resupinatus dealbatus* (Berk.) Singer, uma espécie com basidioma lamelar;
- *Resupinatus incanus* (Kalchbr.) Thorn, Moncalvo & Redhead, citada para o RS por Rick (1960): McDonald (2015) afirma que *R. incanus* é uma espécie sul-africana e a citação de Rick provavelmente é errônea;
- *Solenia navispora* Rick, descrita para o RS (Rick, 1960): nenhuma exsicata registrada como *Solenia navispora* foi encontrada na coleção de Rick no PACA;
- *Stromatocyphella conglobata* (Burt) W.B. Cooke: de acordo com McDonald (2015), os espécimes do RS identificados por Rick e que estão depositados no herbário BPI estão mal identificados.

5. Considerações finais

Se for levado em conta que aproximadamente 120 espécies de fungos cifeloides são conhecidas, podemos concluir que o conhecimento sobre esse grupo de fungos no Brasil não é assim tão incipiente (48 spp. representam 40% do total). Entretanto, acredita-se que esses registros são poucos em contraste com sua diversidade real, já que o tamanho diminuto dos basidiomas faz com que eles sejam pouco coletados e preservados nos herbários brasileiros. Novas coletas, assim como a obtenção de cultivos puros dessas coleções, são desejáveis para proporcionar uma base para estudos de filogenia molecular do grupo. Ainda, é provável que novos táxons sejam descobertos como resultado de novos inventários.

O treinamento de novos taxonomistas especialistas no grupo também é necessário, pois existem poucos especialistas no mundo. Publicações de novos estudos, descrições e chaves são desejáveis, já que grande parte da literatura sobre o grupo está disponível apenas em alemão.

6. Referências

- Agerer R. 1979. Typusstudien an cyphelloiden Pilzen - I. Zur Identität von *Lachnella alboflavida* Bres. ex W.B. Cooke. *Zeitschrift für Mykologie* 45: 191–194.
- Agerer R. 1983. Typusstudien an cyphelloiden Pilzen - IV. *Lachnella* Fr. s.l. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 19: 163–334.
- Agerer R. 1986. “*Cyphellaceae*” versus *Tricholomataceae*, or what is a family? Atti del Convegno Internazionale del 10-15 settembre 1984. Centro Studi per la Flora Mediterranea, Borgo Val di Taro, Italy. pp. 9–27.
- Agerer R., Oberwinkler F. 1979. Cyphelloide Tremellaceen. *Beihefte zur Sydowia* 8: 26–32.
- Albuquerque H.R., Araújo J.P.M., Putzke J. 2007. *Chromocyphella muscicola* (Fr.) Donk. (Basidiomycota, Agaricales): primeira citação para o Brasil. *Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre* 5(2): 999–1001.
- Blackwell M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–438.
- Bodensteiner P. 2006. Maireina W.B. Cooke. *Morphologisch-anatomische Untersuchungen an einer Gattung cyphelloider Homobasidiomyceten*. Munique, Alemanha (Tese de Doutorado, Universidade Luís Maximiliano de Munique, LMU). 120p.
- Bodensteiner P. 2007. *Maireina afibulata* and *M. attenuatipilis*, new members of the cyphelloid genus *Maireina* (Basidiomycota, Agaricomycetes). *Mycological Progress* 6: 221–228.
- Bodensteiner P., Agerer R. 2003. *Nochascypha jacksonii* comb. nov. and *N. paraensis* comb. nov., additional members of the cyphelloid genus *Nochascypha* formerly placed in *Maireina*. *Mycological Progress* 2(4): 297–304.
- Bodensteiner P., Binder M., Moncalvo J.M., Agerer R., Hibbett D.S. 2004. Phylogenetic relationships of cyphelloid homobasidiomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 501–515.
- Bononi V.L.R., Trufem S.F.B., Grandi R.A.P. 1981. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil, depositados no herbário do Instituto de Botânica. *Rickia* 9: 37–53.
- Cannon P., Aguirre-Hudson B., Aime M.C., Ainsworth A.M., Bidartondo M.I. et al. 2018. Definition and diversity. In: K.J. Willis (ed.), *State of the World's Fungi 2018*, pp. 4–11. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Cooke, W.B. 1957. The Porotheleaceae: *Porotheleum*. *Mycologia* 49: 680–693.
- Cooke W.B. 1961. The cyphelloid fungi: a study in the Porotheleaceae. *Beihefte zur Sydowia* 4: 1–144.
- Donk M.A. 1959. Notes on ‘Cyphellaceae’ – I. *Persoonia* 1: 25–110.
- Donk M.A. 1966. A reassessment of the Cyphellaceae. *Acta Botanica Neerlandica* 15: 95–101.
- Gorjón S.P., Jesus M.A. 2014. *Rectipilus stromatoides* sp. nov. (Agaricales, Basidiomycota), a new cyphelloid fungus from the Brazilian Amazon. *Mycosphere* 5(2): 393–396.
- Hennings P. 1897. Beiträge zur Pilzflora Südamerikas II. *Hedwigia* 36(4): 190–246.
- Hennings P. 1908. Fungi Paraënses III. *Hedwigia* 48: 101–117.
- McDonald J. 2015. *Morphological and Molecular Systematics of Resupinatus* (Basidiomycota). London, Canadá (Tese de Doutorado, Universidade de Western Ontario). 299p.
- Meijer A.A.R. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian State of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal, Curitiba* 68: 1–55.
- Nogueira-Melo G.S., Ryvarden L., Gibertoni, T.B. 2011. First record of *Resupinatus poriaeformis* (Agaricomycetes) from South America. *Mycotaxon* 117: 423–427.

- Putzke J. 1994. Lista dos fungos Agaricales (Hymenomycetes, Basidiomycotina) referidos para o Brasil. *Caderno de Pesquisa, Sér. Biol., Santa Cruz do Sul* 6(2): 1–189.
- Putzke J. 2002. Agaricales (Fungos – Basidiomycota) pleurotóides no Rio Grande do Sul. I. *Anthracoephyllum*, *Aphyllotus*, *Campanella*, *Chaethocalathus* e *Cheimonophyllum*. *Caderno de Pesquisa, Sér. Biol., Santa Cruz do Sul* 14(1): 45–66.
- Redhead S.A. 1984. *Arrhenia* and *Rimbachia*, expanded generic concepts, and a reevaluation of *Leptoglossum* with emphasis on muscicolous North American taxa. *Canadian Journal of Botany* 62: 865–892.
- Reid D.A. 1964. Notes on some fungi of Michigan - I. Cyphellaceae. *Persoonia* 3: 97–154.
- Rick J. 1906. Pilze aus Rio Grande do Sul (Brasilien). *Brotéria* 5: 5–53.
- Rick J. 1931. Telephoraceas Riograndenses. *Egatea* 16: 39–44; 116–124; 199–206.
- Rick J. 1959. Basidiomycetes eubasidii in Rio Grande do Sul – Brasilia. 2. Thelephoraceae. *Iheringia, Sér. Botânica* 4: 61–124.
- Rick J. 1960. Basidiomycetes eubasidii in Rio Grande do Sul – Brasilia. 4. Meruliaceae, Polyporaceae, Boletaceae. *Iheringia, Sér. Botânica* 7: 193–295.
- Singer R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. 4th Ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Singer R. 1989. New taxa and new combinations of Agaricales (Diagnoses fungorum novorum Agaricalium IV). *Fieldiana Botany* 21: 1–133.
- Spezzazzini C. 1889. Fungi Puiggariani. Pugillus 1. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba* 11(4): 381–622.
- Sulzbacher M.A., Desjardin D.E., Putzke J. 2008. *Calathella columbiana* (Basidiomycota): new record of a cyphelloid fungus from Brazil. *Mycotaxon* 105: 37–42.
- Sulzbacher M.A., Coelho G., Cortez V.G. 2009. Studies on cyphelloid fungi in southern Brazil. The genus *Phaeosolenia* Speg. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 33: 91–96.
- Taylor D.L, Hollingsworth T.N., McFarland J.W., Lennon N.J., Nussbaum C., Ruess R.W. 2014. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological Monographs* 84(1): 3–20.
- Thorn R.G., Barron G.L. 1986. *Nematoctonus* and the tribe Resupinateae in Ontario, Canada. *Mycotaxon* 25: 321–453.
- Thorn R.G., Moncalvo J.M., Redhead S.A., Lodge D.J., Martín M.P. 2005. A new poroid species of *Resupinatus* from Puerto Rico, with a reassessment of the cyphelloid genus *Stigmatolemma*. *Mycologia* 97(5): 1140–1151.
- Trierveiler-Pereira L., Thorn R.G., Gugliotta A.M. 2019a. Type studies on cyphelloid species (Agaricomycetes, Basidiomycota) described by Rick kept at Herbarium PACA. *Phytotaxa* (submitted).
- Trierveiler-Pereira L., Baltazar J.M., Thorn R.G., Gugliotta A.M. 2019b. Novel cyphelloid fungi in *Glabrocypbella*, *Heteroscypha*, and *Rectipilus* from Brazil. *Mycotaxon* 143(3): 481–488.
- Viégas A.P. 1945. Alguns fungos do Brasil VII-VIII. Cyphellaceae e Thelephoraceae. *Bragantia* 5: 253–290.

Exposição ambiental a azólicos e seleção de cepas fúngicas resistentes: impacto clínico

MACÊDO, Danielle Patrícia Cerqueira¹; CABRAL, Marylia Eduarda do Nascimento¹;
SANTOS, Franz de Assis Graciano dos²; OLIVEIRA, Ertênia Paiva²; LIMA-NETO, Reginaldo Gonçalves de³;
NEVES, Rejane Pereira².

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

² PG Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco

³ Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco

E-mails: daniellemacedo28@gmail.com, marilya.eduarda@gmail.com, franz.assis@gmail.com, oliveiraertenia@gmail.com, goncalves_reginaldo@hotmail.com, rejadel@yahoo.com.br

Resumo

A recente emergência de fungos multirresistentes, tanto fitopatogênicos como os agentes de infecções oportunistas em seres humanos, tem sido motivo de grande preocupação mundial. A pressão seletiva de fungos resistentes nos mais variados ambientes é inegável, tendo sido destacado o uso de triazólicos na agricultura como fator relevante. Os agrotóxicos fungicidas têm como função inibir o crescimento de fungos patogênicos da agricultura; no entanto, os fungos patogênicos humanos também estão presentes no ambiente associado ao solo, plantas e materiais em decomposição. Diversos fatores que influenciam têm sido investigados e discutidos na literatura. O objetivo deste estudo foi sumarizar as informações sobre os antifúngicos triazólicos de uso na agricultura e alertar sobre o impacto clínico destes na seleção de cepas fúngicas resistentes. Amplo destaque foi dado nos artigos às cepas resistentes de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Candida*, que tiveram contato ambiental com drogas triazólicas ou mesmo pelo consumo de alimentos. Considera-se urgente a busca por novas alternativas na agricultura e novos compostos com atividade antifúngica a fim de evitar um colapso global quanto ao tratamento de infecções graves causadas por estes micro-organismos.

Palavras-chaves: Fungos oportunistas, Resistência cruzada, Triazólicos, Agricultura.

1. Introdução

Azólicos são antifúngicos amplamente utilizados no controle de doenças infecciosas tanto em humanos quanto em plantas. Contudo, o surgimento de cepas fúngicas resistentes tem sido alvo de discussões tanto na medicina quanto na agricultura. O uso não racional desta classe de antifúngicos alvo-específicos pode contribuir fortemente para a seleção de cepas clínicas resistentes, expandindo o espectro de resistência a múltiplas drogas antifúngicas. A emergência de resistência em fungos de interesse clínico tem sido relatada e relacionada à exposição aos fungicidas utilizados em agrossistemas frente fungos fitopatógenos (Ribas *et al.*, 2016).

Apesar da maioria das discussões versarem sobre espécies de *Fusarium* e *Aspergillus*, leveduras do gênero *Candida* parecem receber influências dos triazoles ambientais, conduzindo a casos clínicos refratários aos tratamentos. Estes patógenos fúngicos são de ocorrência cosmopolita e, apesar de serem de baixa patogenicidade, são capazes de causar infecções oportunistas em humanos (Chowdhary *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2016).

Casos de micoses oportunistas por cepas de *Fusarium* e *Aspergillus* resistentes já foram documentados na literatura, porém a origem da resistência geralmente é pouco discutida, sendo normalmente relacionada ao uso profilático de triazoles ou equinocandinas em pacientes hematológicos ou transplantados (Verweij *et al.*, 2016). Aspergilose e fusariose são micoses importantes em imunossuprimidos, com primo-infecção geralmente pulmonar e potencial capacidade de angioinvasão e disseminação (Al-Hatmi *et al.*, 2016; Verweij *et al.*, 2016).

De forma semelhante, a frequência de infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* aumentaram nos últimos anos em consequência a diferentes fatores, dentre os quais, o aumento de indivíduos imunocomprometidos e a utilização desordenada de antibióticos de amplo espectro (Panwar e Faujdar, 2016). Esses

microrganismos estão normalmente presentes em distintos sítios anatômicos abrangendo o trato gastrointestinal de 20 a 80% dos adultos saudáveis e a mucosa vaginal de 20 a 30% das mulheres (Okungbowa *et al.*, 2003; Schulze e Sonnenborn, 2009). Apesar das discussões envolvendo o tratamento de micoses importantes, bem como a origem de resistência em *Candida*, ainda são escassos debates que correlacionem a exposição destas leveduras (tanto de microbiota quanto ambientais) a azólicos agrícolas, assim como suas consequências clínicas diretas.

2. Metodologia

Foram realizadas pesquisas em bases de artigos científicos como PubMed, Medline, Scielo e *Web of Science*. Como critérios de inclusão estão: artigos em português ou inglês, que abordem a temática “uso de triazólicos na agricultura”, “use of triazolics in agriculture”, “resistência fúngica”, “fungal resistance”, “impacto clínico da resistência cruzada” e “clinical impact of cross-resistance”.

Os artigos foram lidos na íntegra e as informações foram confrontados para discussão.

3. Antifúngicos de uso agrícola

Atualmente, existem vários compostos, com atividade antifúngica, disponíveis para controle da propagação dos fungos fitopatogênicos. No entanto, são os antifúngicos azólicos os mais utilizados para fins agrícolas devido à sua eficácia contra uma ampla gama de fungos (Price *et al.*, 2015).

O uso dos antifúngicos azólicos na agricultura começou em meados da década de 1960; desde então, esses compostos tem sido usados extensivamente (Lucas, 2014). Os azóis usados na agricultura são geralmente pulverizados ano após ano sobre a área cultivada para controlar mildios, ferrugem e outras doenças em cereais, plantas ornamentais, vegetais, frutas e vinhas. De acordo com Matthews (2000), o uso generalizado destes compostos resulta na contaminação do ar, plantas e solo com partículas ativas dos fungicidas triazólicos.

Os compostos mais comuns usados na União Europeia são imidazóis (Figura 1A), triazóis (Figura 1B), fluconazol (Figura 1C) e tebuconazol (Figura 1D) (Lelièvre *et al.*, 2013). Eles são amplamente utilizados na fase de pré-colheita, ambientes de cultivo de grãos e gramíneas e fase pós-colheita para evitar a deterioração por leveduras como espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Saccharomyces cerevisiae*, ou fungos filamentosos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Geotrichum*. Além disso, eles também são aplicados para tratar plantas com infecção quando estas se tornam aparentes (Hof, 2008; Barth *et al.*, 2009; Dijksterhuis *et al.*, 2013).

Em 2002, de acordo com a direção geral da Comissão Europeia, Saúde e Defesa do Consumidor, nas instruções do fabricante, doses de 100 g/ha devem ser usadas, correspondendo aproximadamente a 10 mg de azóis aplicados a 1 m² da superfície da planta. Tal comissão revelou que anualmente cerca de 50% do total de área cultivada com produção de cereais e videiras na Europa é tratada com fungicidas azólicos.

Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos assumindo o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Em 2010, o consumo de agrotóxicos no Brasil teve acréscimo de 190% e os fungicidas corresponderam a 14% nesse mercado (Sindag, 2009). De acordo com a FAO, Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação (Faostat, 2008), o consumo de fungicidas atingiu uma área potencial, em torno de, 800 mil hectares. Os números apontam o uso vasto de ingredientes ativos como fungicidas em áreas de plantação de hortaliças no Brasil, podendo ser 8 a 16 vezes maior nessa produção do que o utilizado na cultura da soja. Indicando que, cerca de 20% da comercialização de fungicidas no Brasil é destinada ao uso em plantações de hortaliças consumidas pela população (Almeida *et al.*, 2009).

Em 2009, foram comercializadas 725 mil toneladas de produtos formulados. As principais classes são os herbicidas com 59% (429.693 toneladas), seguido por inseticidas e acaricidas com 21% (150.189 toneladas), fungicidas com 12% (89.889 toneladas) e outros com 8% (55.806 toneladas). Considerando os ingredientes ativos, foram comercializadas 335.816 toneladas, das quais 61% (202.554 toneladas) foram herbicidas, 18% (61.254 toneladas) inseticidas e acaricidas, 11% (37.934 toneladas) antifúngicos e 10% (34.074 toneladas) outras classes. Neste uso maciço de antifúngicos, destaca-se a soja como a principal cultura (48%), seguida por milho (11%), cana (8%), algodão (7%), café (4%), citros (3%) entre outros. O Mato Grosso é o Estado

líder em vendas (20%), seguido por São Paulo (15%), Paraná (14%), Rio Grande do Sul (11%), Goiás (10%) e Minas Gerais (9%) (Mcdougall, 2010).

Os principais antifúngicos utilizados no Brasil são antifúngicos do grupo químico benzimidazol, que possui como compostos ativos o carbendazim, tiofanato metílico ou tiabendazol (Boikov, 2017). Os fungicidas desse grupo apresentam ação sistêmica e são inibidores da síntese de esteróis, impedindo não só a germinação de esporos e a formação do tubo germinativo, mas também a formação do apressórios e ramificação de hifas as quais se aderem fortemente ao substrato, podendo invadir o tecido vegetal (Dias, 2008; Kirk *et al.*, 2008).

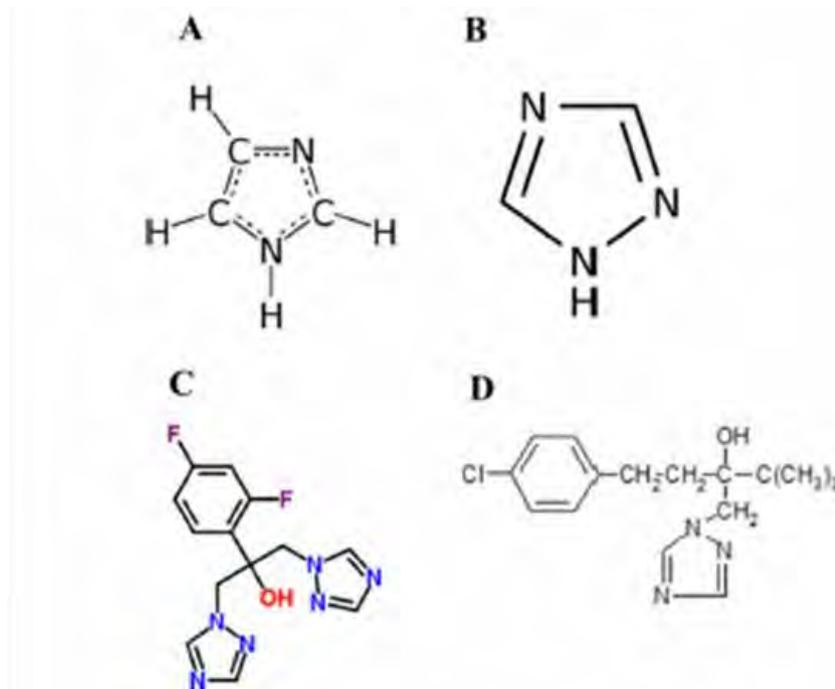


Figura 1. Estrutura química de (A) imidazol, (B) 1,2,4 – triazol, (C) fluconazol e (D) tebuconazol.

Fonte: Revista de Química Agrícola e Alimentar

O aumento do uso de agrotóxicos na agricultura ocasiona contaminação residual do solo com esses produtos. Quando os agrotóxicos são aplicados, existe a possibilidade dessas substâncias exercerem efeitos em micro-organismos não necessariamente aqueles para os quais foi destinada a sua aplicação, inclusive os da microbiota de solo (Silva, 2012)

A exposição ambiental a componentes azólicos abre caminho para a seleção e multiplicação de fungos resistentes a esses compostos. Assim, isolados resistentes podem ser inalados ou ingeridos ou, ainda, introduzidos por traumatismos em indivíduos que trabalham em plantações ou vivem próximo a essas áreas (Yang *et al.*, 2012).

Assim, uma vez tendo contato com o ser humano, estes patógenos oportunistas irão desenvolver as mais variadas manifestações clínicas, com a característica da resistência adquirida nestes ambientes (Lacaz *et al.*, 2002).

3.2. Antifúngicos de mercado e suas limitações

Muitos antifúngicos estão disponíveis no mercado, sendo encontrados em formulações para administração oral em comprimidos, ou ainda para uso tópico na forma de cremes, loções, bem como comprimidos vaginais, supositórios e tampões revestidos, além dos injetáveis (Sobel, 2007). Esses medicamentos são separados em diferentes grupos como os poliênicos e azólicos que possuem atuação na membrana celular e as equinocandinas que atuam na parede celular. As opções terapêuticas diante de infecções fúngicas ainda são escassas, especialmente nos casos de refratariedade no tratamento, com prognóstico desfavorável (Mellado *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2013).

3.3. Impacto clínico do uso de triazólicos na agricultura

A resistência aos azólicos pode resultar da exposição prévia a compostos azólicos *in vivo* (pacientes tratados com azol) ou como resultado da presença destes compostos no meio ambiente, ou seja, resíduos agrícolas (Snelders *et al.*, 2008). O uso massivo de azóis na agricultura pode selecionar cepas resistentes inclusive da microbiota fúngica, tanto na natureza, como também nos nichos endógenos humanos. Esta perturbação na ecologia da microbiota pode resultar em alterações entre a população de fungos clinicamente importantes; fungos patogênicos humanos podem, portanto, persistir e evoluir com seu potencial patogênico. Nessa situação, os riscos para a saúde podem aumentar seriamente. Além disso, novas formas de resistência por mutações também poderiam se desenvolver no ambiente e conseqüentemente como patógeno oportunista (Hof, 2001).

Segundo Snelders *et al.* (2008), a resistência aos azólicos está confinada não apenas aos pacientes submetidos à terapia com azol, mas também em muitos pacientes sem exposição prévia conhecida a drogas azólicas. Como a inalação de esporos de *Aspergillus* no ar é a via comum de infecção por este fungo, alguns autores sugerem a hipótese de que a resistência poderia ter sido adquirida a partir de uma fonte ambiental comum, por inalação de esporos e subsequente desenvolvimento de infecção resistente aos azóis.

Existem duas formas de resistência, a primária (ou intrínseca) e a secundária. Na resistência primária, o fungo não pode ser inibido mesmo por altas concentrações de um medicamento antifúngico. Por exemplo, *A. fumigatus* é intrinsecamente resistente ao fluconazol não sendo sensível a esta droga. Da mesma forma, *C. krusei* e *C. glabrata*, são intrinsecamente resistentes ao fluconazol. Por outro lado, a resistência ao fluconazol em *C. albicans* pode surgir durante um tratamento empírico, profilático ou mesmo prolongado, caracterizando um exemplo de resistência secundária (Perea *et al.*, 2001).

Em 2008, na Holanda, Snelders e colaboradores forneceram pela primeira vez evidências de que pacientes com aspergilose invasiva podem ter adquirido *A. fumigatus* resistente ao azol no meio ambiente. De acordo com este estudo, cepas resistentes de *A. fumigatus* a azólicos medicinais foram encontradas no solo e compostagem de áreas próximas ao hospital de admissão. A dominância de um único mecanismo de resistência e do mecanismo genético em homologia entre os isolados clínicos e ambientais sugeriram que a aquisição de isolados resistentes ao azol do ambiente era a via de infecção mais importante. A resistência do azol entre os isolados de *A. fumigatus* não foi apenas encontrada em hospitais holandeses; isolados resistentes também foram detectados em vários países europeus, como Espanha, Bélgica, Dinamarca, Suécia e França (Mellado *et al.*, 2007; Arendrup *et al.*, 2008; Lagrou *et al.*, 2008; Snelders *et al.*, 2008).

No caso descrito por Snelders e colaboradores (2008), concluiu-se que dois modelos de resistência podem ter-se desenvolvido. Um deles ocorreu logo após o período de exposição ao tratamento com azólico, como pode ocorrer em contextos clínicos, apoiados por várias mutações, e o outro modelo teria sido facilitado por um único mecanismo, mutação TR/L98H, que ocorre em fungos que sofrem pressão seletiva por triazólicos agrícolas. Esse tipo de mutação começou a se espalhar pelo mundo e atualmente também foi descrita em outros países (Chowdhary *et al.*, 2012).

Um estudo realizado na França descreveu um caso clínico de agricultor francês que desenvolveu aspergilose invasiva causada por um *A. fumigatus* resistente ao azol e com a mutação TR34/L98H após o transplante de células-tronco (Rocchi *et al.*, 2014). Este agricultor tinha trabalhado em campos pulverizados com fungicida de *A. fumigatus*, dos quais isolados TR34/L98H também foram recuperados. Este estudo apoia a suposição de que os seres humanos podem de fato estar infectados com isolados ambientais resistentes aos azólicos.

Denardi *et al.* (2018) avaliaram a susceptibilidade de 105 isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* aos azólicos, anfotericina B e equinocandinas. Os autores constataram que 25% dos isolados apresentaram resistência ao itraconazol, seis isolados exibiram resistência ao posaconazol, apenas 1 isolado clínico foi resistente ao voriconazol e as Concentrações inibitórias mínimas (CIM's) dos testes frente à anfotericina B foram elevadas, porém ainda sensíveis.

Patógenos fúngicos humanos e animais, como *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* também prosperam no ambiente, incluindo em plantas e produtos alimentares. Segundo a literatura, sabe-se que apenas algumas espécies de leveduras são endógenas à microbiota humana saudável; contudo, na maioria das ocasiões,

os fungos patogênicos são adquiridos do meio ambiente. Portanto, isolados resistentes podem desenvolver resistência após um processo seletivo nas lavouras ou mesmo em outros ecossistemas. Desta forma, a probabilidade de um indivíduo se expor a fungos resistentes no ambiente é real e bastante elevada. No entanto, o estresse causado por azóis residuais que pode estar presente em vegetais e outros produtos alimentícios modificando a microbiota fúngica nativa endógena dos seres humanos, não deve ser negligenciado, uma vez que pode contribuir para o surgimento de resistência antifúngica e doença (Chowdhary *et al.*, 2012).

4. Discussão

Nas últimas duas décadas, infecções fúngicas clinicamente importantes tornaram-se mais prevalentes devido ao progresso médico o qual tem permitido a sobrevivência de um número crescente de pacientes imunocomprometidos. No entanto, a resistência a drogas antifúngicas também se tornou um problema médico crítico (Laxminarayan *et al.*, 2006).

O uso de azóis na agricultura pode ser justificado pelo fato de que esses compostos não são caros e que eles exibem amplo espectro de ação frente às infecções fúngicas em plantas de interesse econômico. No entanto, uma vez que os azóis são moléculas muito estáveis, elas podem persistir ativas no solo e na água por vários meses, também como em várias frutas e vegetais (Trosken *et al.*, 2005). Dados da literatura mostram que quantidades consideráveis de resíduos azólicos poderiam persistir em alguns alimentos por um longo período e desenvolver ação no consumidor (Hof, 2001).

Esta discussão acerca da exposição aos azólicos através do contato ambiental ou ingestão por alimentos ainda é escassa no Brasil. Contudo, faz-se relevante uma vez que dois casos clínicos já foram comprovados, fortalecendo a tese de que cepas resistentes circulam nos ambientes agrícolas e que estas podem causar infecção de difícil tratamento.

Tem sido proposto que pode haver uma relação direta entre o desenvolvimento de resistência aos fungicidas azólicos utilizados na prática agrícola e no desenvolvimento de resistência a antifúngicos azólicos observados em ambientes clínicos (Laxminarayan *et al.*, 2006). Assim, o conhecimento sobre a taxa e extensão do surgimento de resistência dos fungos e se esta resistência é reversível ou não é uma questão muito relevante para a medicina clínica (Faria *et al.*, 2014).

Por se tratarem de micoses oportunistas, estas oferecem maior risco a pacientes que possuam imunossupressão importante como em pacientes com distúrbios hematológicos, transplantados e queimados graves (Suleyman e Alangaden, 2016). Há diversos relatos de casos reportados que corroboram a alta frequência de aspergilose invasiva em pacientes hospitalizados além de comprovada resistência aos medicamentos atuais. Os pacientes respondem bem ao tratamento com anfotericina B e suas formulações, contudo a nefrotoxicidade limita seu uso em pacientes hematológicos, transplantados e renais graves. Voriconazol tem demonstrado excelente resposta terapêutica, mas são escassos os estudos que evidenciam os tipos de resistência já adquiridos para este fármaco (Zhuanggui *et al.*, 2017; Denardi *et al.*, 2018).

Denardi *et al.* (2018) realizou no Brasil um estudo *in vitro* com 105 cepas de *A. fumigatus* e *A. flavus*, de origem ambiental e clínica. Foram revelados perfis de resistência aos antifúngicos de escolha como voriconazol e posaconazol. Estes resultados recentes demonstram que, até mesmo os fármacos de eleição já estão em risco quanto à sua eficácia frente fungos resistentes.

Neste contexto também se faz relevante discutir sobre os casos refratários de Fusariose. Espécies de *Fusarium* representam uma constante preocupação aos agricultores por ser considerada espécie fitopatogênica clássica. Igualmente, este fungo pode ser agente etiológico de infecções em humanos, inclusive de curso fatal (Zaitz *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2011). Em pacientes imunocomprometidos, estes fungos são capazes de causar desde infecções superficiais a infecções disseminadas, sendo estas com altas taxas de mortalidade. Quanto ao tratamento, esta micose ainda revela problemas, uma vez que não existem consensos para tal e a terapia depende de respostas *in vitro* ou baseia-se em resultados de casos já descritos na literatura (Nucci *et al.*, 2010; Carneiro *et al.*, 2013; Esnakula *et al.*, 2013).

Embora estudos brasileiros mais recentes sobre o perfil de susceptibilidade de cepas fúngicas tenham sido realizados, são necessárias análises mais detalhadas, envolvendo inclusive estudos genéticos, a fim de desvendar a origem das resistências que mais atuam nos agentes etiológicos de origem fúngica. Segundo Denardi *et al.* (2018), em estudo *in vitro* com *Aspergillus*, uma porcentagem significativa de cepas clínicas e ambientais de *A. fumigatus* foi resistente aos azólicos; enquanto *A. flavus* demonstrou menor susceptibilidade à anfotericina B e elevados CIM's para equinocandinas.

Estudos utilizando um maior número de cepas de diferentes regiões do Brasil são urgentes incluindo a avaliação da origem das cepas, tanto com leveduras como com fungos filamentosos, para implementar uma manejo destas infecções oportunistas refratárias aos tratamentos existentes em nossos centros médicos, reduzindo as taxas de mortalidade e gerando condições de controle epidemiológico e busca por novos fármacos.

5. Considerações Finais

De acordo com os artigos avaliados pode-se concluir que:

Triazólicos antifúngicos são amplamente utilizados como forma de combate aos fungos fitopatogênicos na agricultura e seu uso indiscriminado tem impactado no perfil de resistência dos fungos que causam infecções em humanos, apesar destes fármacos possuírem diferenças estruturais importantes aos utilizados nos centros médicos.

A existência de um grande número de drogas antifúngicas de uso na agricultura, em contraste ao número limitado para uso clínico, é considerada fator de risco à seleção de cepas resistentes ou multirresistentes.

Espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Candida* têm apresentado diferentes níveis de resistência aos antifúngicos de uso hospitalar, fruto de pressão seletiva pelo uso dos azólicos na agricultura e consumo de alimentos com resíduos dos triazólicos.

A maioria dos estudos que abordam os mecanismos de resistência por exposição ambiental aos triazólicos são com *Aspergillus* spp.

Considera-se urgente a busca por novos compostos com atividade antifúngica, uma vez que já foram citados fungos multirresistentes na literatura.

6. Referências

- Al-Hatmi A.M.S., Meis J.F., De Hoog G.S. 2016. *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS Pathog.*, 12 (4): e1005464.
- Almeida VES, Carneiro FF, Vilela NJ. 2009. Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar, riscos socioambientais e políticas públicas para promoção da saúde. *Tempus Actas de Saúde Coletiva*. v. 3, n 4, p. 84-99.
- Barth M., Hankinson T.R., Zhuang H., Breidt F. 2009. Microbiological spoilage of fruits and vegetables. In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. p. 135-183.
- Boikov D.A., Locke J.B., James K.D., Bartizal K., Sobel J.D. 2017. *In vitro* activity of the novel echinocandin CD101 at pH 7 and 4 against *Candida* spp. isolates from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. 1355–1358.
- Chowdhary A., Kathuria S., Randhawa H.S., Gaur S.N., Klaassen C.H., Meis J.F. 2012. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51 A* gene in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 67, n. 2, 362–366.
- Colombo A.L., Guimarães T., Camargo L.F.A., *et al.* 2013. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 283–312.
- Denardi L.B., Dalla-Lana G.H., Jesus F.P.K., Santurio J.M., Zanette R.A., Alves S.H. 2018. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases*. v. 22, n.1, p. 30-36.

- Dijksterhuis J., Houbraken J., Samson R.A. 2013. Fungal spoilage of crops and food. In *The Mycota: Agricultural Applications*; Kempken, F., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany; v. 11, p. 35–56.
- FAOSTAT- 2008. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>>
- Faria R.I., Neves M.J., Ricardo E., Santos A.J., Silva A.T., Costa C.S., Cantón E., Rodrigues A.G., Pina V.C. 2014. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 33, n. 12, p. 224.
- Hof H. 2001. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, p. 2987–2990.
- Hof H. 2008. Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine? *Drug Resist. Updates*, v. 11, p. 25–31.
- Jain P.K. *et al.* 2011. Current Status of *Fusarium* Infection in Human and Animal. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 6, n. 3, p. 201–227.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10 ed. Wallingford: CABI, p. 970 .
- Lagrou K., De Vleeschouwer J., Meerseman W., Dupont L., Verleden G., Melchers W.J.G., Verweij P.E., Maertens J. 2008. Triazole resistance among clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *Proceedings of the 3th Advances Against Aspergillosis*. 16–19.
- Laxminarayan R., Mills A.J., Breman J.G., Measham A.R., Alleyne G., Claeson M., Jha P., Musgrove P., Chow J., Shahid-Salles S., Jamison D.T. 2006. Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project. *Lancet*, v. 367, p. 1193–1208.
- Lelièvre L., Groh M., Angebault C., Maherault A.C., Didier E., Bougnoux M.E. 2013. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med. Mal. Infect.* v. 43, n. 139–45.
- Lucas J. 2014. Resistance of QoI fungicides. Implications for cereal disease management in Europe. *Pesticid. Clinical Microbiology*, v.52, n. 5, p. 1724–6.
- Matthews G.A. 2000. *Pesticide Application Methods*; Blackwell Science: Oxford, U.K. v.3,
- Mellado E., Garcia-Effron G., Alcázar-Fuoli L., Melchers W. J., Mendling W., Brasch J. 2012. Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the German Society for Gynecology and Obstetrics, the working group for infections and infectimmunology in gynecology and obstetrics, the German Society of Dermatology, the board of German Dermatologists and the. *Mycoses*, v. 55, n. 3, p. 1–13.
- Mcdougall P. The global agrochemical market in 2010 – preliminary 275 review. Disponível em: <<https://phillipmcdougall.agribusinessintelligence.informa.com/>>. Acesso em: 02 de junho de 2019.
- Nucci M. *et al.* 2010. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 5, p. 561–570.
- Okungbowa F.I., Isikhuemhen O.S., Dede A.P.O. 2003. The distribution frequency of *Candida* species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 20, p. 60–63.
- Panwar S., Faujdar S.S. 2016. Prevalence, Distribution, Risk factors and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida* species in a Tertiary Care Hospital. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5, n. 4, p. 329–337.
- Perea S., Lopez-Ribot J.L., Kirkpatrick W.R., *et al.* 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, p. 2676–2684.
- Price C.L., Parker J.E., Warrilow A.G., Kelly D.E., Kelly, S.L. 2015. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest. Manag. Sci.* v. 71, p. 1054–1058.
- Rocchi S., Daguindau E., Grenouillet F., Deconinck E., Bellanger A.P., Garcia-Hermoso D., Bretagne S., Reboux G., Millon L. 2014. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate with the TR34/ L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* v. 52, n.5, p. 1724–6.

- Schulze J., Sonnenborn U. 2009. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Arzteblatt International*, v. 106, n. 51–52, p. 837–42.
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., *et al.* 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 288–305.
- SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas; Anais do Workshop: Mercado Brasileiro de Fitossanitários; Avaliação da Exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores de Agrotóxicos. Brasília: 28/04/2009.
- Snelders E, van der Lee HAL, Kuijpers J, Rijs AJMM, Varga J, Samson RA, *et al.* 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 5(11): 219.
- Sobel J.D. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, v. 369, p. 1961-1971.
- Suleyman G.; Alangaden G.J. 2016. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*. n. 30, p. 1023-1052.
- Trösken E.R.; Bittner, N.; Volkel, W. 2005. Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, v. 1083, p.113-119.
- Verweij, P.E.; Chowdhary, A.; Melchers, W.J.G.; Meis, J.F. 2016. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis.*; v. 62, n. 3, p. 362-368.
- Yang YL, Lin CC, Chang TP, Lauderdale TL, Chen HT, Lee CF, *et al.* 2012. Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. *PLoS one*; v. 7, n. 4, p.34609.
- Zhuanggui C. *et al.* 2017. Neonatal Cutaneous Invasive Aspergillosis Accompanied by Hemophagocytic Lymphohistocytosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. v. 36, n. 4, p. 423-425.

Acervos micológicos nos herbários brasileiros: Retratando as diferenças regionais

MAIA, Leonor Costa¹; GIBERTONI, Tatiana Baptista¹; GUGLIOTA, Adriana de Mello²;
 LEONARDO-SILVA, Lucas^{3,6}; MOREIRA, Izabel Cristina^{3,6}; SILVEIRA, Rosa Mara Borges da⁴;
 SOTÃO, Helen Maria Pontes⁵; XAVIER-SANTOS, Solange⁶

¹ Herbário URM, Universidade Federal de Pernambuco

² Herbário SP, Instituto de Botânica de São Paulo

³ Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado - UEG

⁴ Herbário ICN, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁵ Herbário MG, Museu Paraense Emílio Goeldi

⁶ Herbário HUEG, Universidade Estadual de Goiás, Campus Anápolis

Emails: leonorcmaia@gmail.com, tbgibertoni@hotmail.com, agugliotta@ibot.sp.gov.br, lucasleo.bio@gmail.com, izacristina26@yahoo.com.br, rosa.silveira@ufrgs.br, helen@museu-goeldi.br, solange.xavier@ueg.br

Resumo

A micota brasileira, como a fauna e a flora, está entre as mais diversas do planeta. Esse patrimônio científico, cultural e econômico deve ser reconhecido e preservado. Uma das formas de documentar é depositando exemplares em herbários. O Brasil tem mais de 200 herbários, 151 dos quais no Index Herbariorum; apenas uma pequena parcela apresenta coleções micológicas. Há grande variação no tamanho dos acervos, desde <100 exemplares (dois herbários) até >90.000 (um herbário). A maioria tem até 15.000 exsiccatas (15 herbários) e quatro tem de 10 a 50.000 fungos. As três maiores coleções encontram-se no: Nordeste (URM - Universidade Federal de Pernambuco), Amazônia (INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e Sudeste (SP - Instituto de Botânica). Entre os 20 herbários ativos **na região Norte**, a metade tem fungos, sendo maior o do INPA (27.000 exsiccatas). O **Nordeste** tem 37 herbários, 14 com acervo micológico; o URM é o único exclusivo para fungos (ca. de 90.000 exemplares). Dos 20 herbários do **Centro-Oeste**, 25% têm coleções de fungos. No **Sudeste** há 75 herbários, 20 com acervos micológicos; a maior coleção é a do herbário SP (ca. de 40.000 exsiccatas). Na região **Sul** há seis coleções com fungos; as maiores são as dos herbários ICN e PACA. Em geral, os acervos têm mais representantes de Basidiomycota e Ascomycota. O pequeno número de herbários com coleções micológicas, e de registros on-line, não reflete a elevada diversidade de fungos no país. Para incrementar as coleções, de modo que representem parte significativa da riqueza, é necessário formar recursos humanos especializados, incentivar as coletas e o depósito dos materiais, e disponibilizar os dados, propiciando mais informações e ampliando o conhecimento sobre a riqueza e a diversidade de fungos do país.

Palavras-chave: Acervos científicos, Biodiversidade, Coleções biológicas.

1. Introdução

Herbários, do latim *herbareum*, representam coleções de algas, fungos ou plantas, ou de parte desses, preservados de modo específico, e servem como documentação da diversidade da flora e da micota de determinado local, região, país ou continente. Esses acervos, em geral de material preservado a seco (desidratado), que é devidamente registrado, são destinados principalmente à conservação e documentação da biodiversidade e a estudos científicos em diferentes áreas do conhecimento. A importância e o valor que se pode atribuir a um herbário estão relacionados principalmente à boa preservação dos espécimes armazenados, assim como à existência de coleções de tipos nomenclaturais, históricas, e de referência para áreas nativas, à qualificação dos dados taxonômicos e à riqueza de informações relacionadas aos metadados.

País megadiverso, o Brasil tem cerca de 200 herbários, dos quais 151 registrados como ativos no Index Herbariorum. O número total de exsiccatas nessas coleções está calculado em cerca de oito milhões de espécimes de algas, fungos e plantas (Gasper & Vieira, 2015; RBH, 2019), o que não reflete a riqueza da flora e da micota

brasileiras. Esse número é baixo quando se compara, por exemplo, com o de alguns herbários europeus, como o do Muséum National d'Histoire Naturelle, em Paris, e do Botanical Garden, em Kew, com cerca de seis e sete milhões de exsicatas, respectivamente, ou herbários norte americanos, como o do New York Botanical Garden, com mais de 7,8 milhões de exemplares.

A distribuição dos herbários no país não é uniforme, nem condiz com o território de cada região, estando mais concentrada na região Sudeste, onde há mais instituições de ensino e pesquisa. Ainda que representem cerca de 64% do território nacional, e detenham a maior parte da biodiversidade do país (IBGE, 2018), as regiões Norte e Centro-Oeste são as menos contempladas com herbários (Figura 1), sediando juntas cerca de 20% dos acervos brasileiros. Isso aponta para fragilidades no testemunho da biodiversidade do país, sobretudo quando se considera os fungos, em geral os menos representados nas coleções (<http://www.cria.org.br>).

Para facilitar a consulta aos dados dos herbários, criou-se um modo de levar para a era digital as informações sobre os espécimes guardados nos armários das coleções. Assim, herbários virtuais foram estabelecidos, de modo que os especialistas podem obter informações e imagens sem precisar ir fisicamente à coleção ou solicitar o material por empréstimo. A partir do trabalho colaborativo, está sendo possível integrar os dados dos herbários brasileiros através de redes, facilitadas pelo desenvolvimento da tecnologia de informação e comunicação, que permitiu ao Brasil ter herbários on-line, com destaque para o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos, que congrega dados de aproximadamente 120 herbários do país (<http://inct.florabrasil.net/>; <http://inct.splink.org.br/>), e do Herbário Virtual Refflora (<http://refflora.jbrj.gov.br/refflora/herbarioVirtual/>); ambos também disponibilizam dados e imagens de coletas do Brasil depositadas em herbários do exterior. Além desses, para atender a uma recomendação da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), do qual o Brasil é um dos países signatários, foi desenvolvida por Iniciativa do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), a plataforma SiBBr (Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira – <http://sibbr.gov.br>), que congrega e disponibiliza dados de coleções botânicas, microbianas, zoológicas, e outras, incluindo as dos herbários virtuais mencionados.

Considerando a relevância do conhecimento e conservação da biodiversidade, os estudos taxonômicos são cada vez mais importantes, principalmente nos Neotrópicos onde muito da diversidade biológica ainda é desconhecida. Quando consideramos os fungos, um grupo megadiverso, mas ainda pouco estudado quando se compara o número de espécies conhecidas (cerca de 120 mil) e o estimado (2,2 a 3,8 milhões) (Hawksworth e Lucking, 2017), torna-se mais urgente o conhecimento sobre as espécies principalmente do Hemisfério Sul, antes que muitas desapareçam pela perda de habitat. Na realização destes estudos taxonômicos e sistemáticos, as coleções micológicas são de fundamental importância. Este capítulo mostra a representatividade dos fungos nos herbários no Brasil,

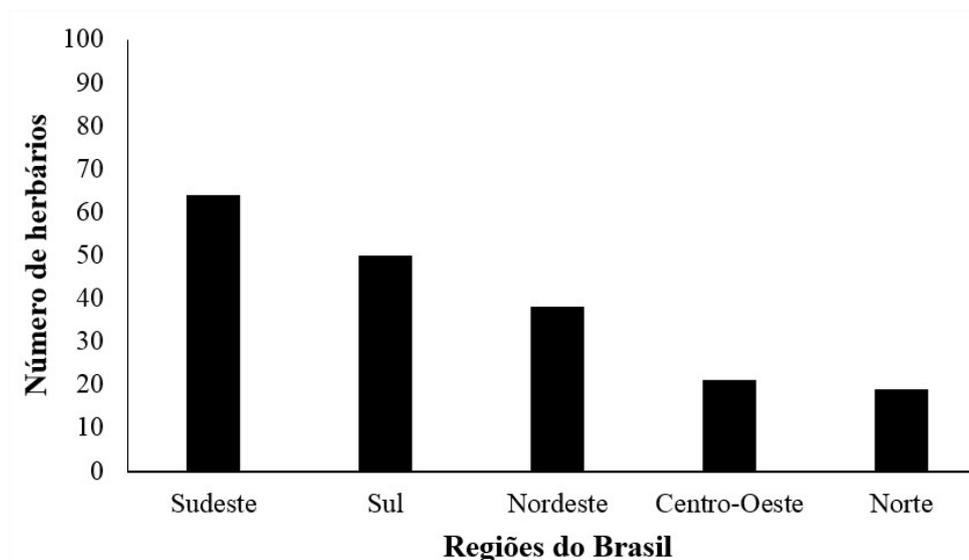


Figura 1. Distribuição quantitativa dos herbários brasileiros quanto à região geográfica. Fonte: <http://www.cria.org.br>.

detalhando as coleções por região, de modo a contribuir com elementos que incentivem a discussão e promovam iniciativas que levem ao incremento e à melhoria da qualidade das coleções micológicas no Brasil.

2. Obtenção de dados

Para obtenção e análise dos dados, foram consultados sites das Instituições e de plataformas como: Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>); GBIF (Global Biodiversity Information Facilities – <https://www.gbif.org>) *speciesLink* (<http://splink.cria.org.br/>); INCT Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (<http://inct.florabrazil.net/>); REFLOA (<http://reflora.jbrj.gov.br/>); JABOT (<http://jabot.jbrj.gov.br/v2/consulta.php>), além do Catálogo da Rede Brasileira de Herbários (RBH) e diversas publicações, e realizada consulta aos curadores de herbários e outros pesquisadores. Os acrônimos dos herbários estão de acordo com o Index Herbariorum (<http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>), Gasper e Vieira (2015) e RBH (2019).

3. Coleções com fungos

3.1. Herbários da Região Norte

Analisando os dados dos 20 herbários ativos da região Norte, apenas a metade possui coleção de fungos, sendo que cada estado da Amazônia brasileira tem pelo menos um desses (Tabela 1) e apenas um é exclusivamente micológico, o HJP (Herbário Micológico Jair Putzke), da Universidade Federal do Amazonas, criado em 2009. Nos demais herbários, as coleções de fungos estão no mesmo espaço do acervo de plantas. Os herbários com maior número de espécimes são os do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Embrapa Amazônia Oriental (IAN) e da Faculdade São Lucas (FSL) (Tabela 1).

O herbário João Murça Pires (MG), do MPEG, foi o primeiro da Amazônia, criado em 1895 pelo botânico suíço Jacques Huber (Viana *et al.*, 2015). Atualmente tem acervo em torno de 230.000 registros, sendo a coleção de fungos representada por cerca de 8.300 espécimes, entre estes, 56 tipos nomenclaturais e uma interessante coleção histórica que tem entre os coletores Jacques Huber, Ernst Ule e C. F. Baker. Os principais grupos de fungos são Basidiomycota (Agaricomycetes, Pucciniales) e Ascomycota (fungos conidiais e líquens). A coleção encontra-se em processo de informatização, com 65% dos metadados digitados inicialmente no programa Brahm e atualmente no Specify. Esta coleção tem subcuradoria realizada por um micólogo.

Tabela 1. Relação dos herbários dos estados da Amazônia brasileira com coleção de fungos com sigla, nomes, instituição, acervo e referência para base de dados.

Estado / Cidade	Acrônimo / Herbário	Instituição	Acervo total	Coleção de fungos	Ref.
Acre - Rio Branco	UFACPZ - Herbário do Acre	Universidade Federal do Acre / Parque Zoológico	18.983	38*	1
Amapá - Macapá	HAMAB - Herbário Amapaense	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá - IEPA	20.000	300*	1
Amazonas - Manaus	HJP - Herbário Micológico Jair Putzke	Universidade Federal do Amazonas	120	120	4
	INPA - Herbário do INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia	273.000	2.7000	1
Pará - Belém	IAN - Herbário da Amazônia Oriental	Embrapa Amazônia Oriental	195.000	1.365	1
	MG - Herbário João Murça Pires	Museu Paraense Emílio Goeldi	230.000	8.500	2,3
Pará - Santarém	MFS - Herbário Prof ^a . Marlene F. da Silva	Universidade do Estado do Pará	9.000	1.200	4
	HSTM - Herbário da UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará	11.527	868	4
Rondônia - Porto Velho	HFSL - Herbário Ary Tupinambá Penna Pinheiro	Faculdade São Lucas	7.046	1.300	1
Roraima - Boa Vista	MIRR - Herbário do Museu Integrado de Roraima	Instituto de Amparo à Ciência, Tecnologia e Inovação de Roraima	11.000	?*	1

¹<http://inct.splink.org.br/>; ²SIBBr; ³MPEG <https://www.museu-oeldi.br/assuntos/colecoes/biologicas/botanica/herbario-mg>; 4comunicação do curador.

*fungos inseridos no reino Plantae em bases de dados.

O herbário IAN, criado em 1945, quando a instituição era denominada Instituto Agrônomo do Norte (atualmente Embrapa Amazônia Oriental), tem principalmente fungos fitopatogênicos, ou associados a plantas, mas representantes de macrofungos (Agaricomycetes) e fungos liquenizados também estão depositados. A coleção de fungos ainda não está disponibilizada online.

O maior acervo entre os herbários da Amazônia é o do INPA, fundado em 1954. Tem cerca de 27.000 registros de fungos, com aproximadamente 761 tipos nomenclaturais coletados na Amazônia brasileira. A maioria do acervo tem representantes de Basidiomycota (15.005) e Ascomycota (6.800); o restante está em diversos grupos de fungos. Destaque para o número de espécimes tipo de fungos, que chega quase a 800. A coleção encontra-se quase 100% informatizada (programa Brahms), com dados e imagens online (<http://splink.cria.org.br/manager/detail?resource=INPA>). Nesta base de dados estão 2.756 táxons representando 937 gêneros. Cerca de 9.700 registros constam como indeterminados para gêneros, indicando a necessidade de visitas de especialistas para ampliação do número de espécies classificadas no acervo.

Não foi possível precisar o número de registros de fungos para quatro dos herbários da Amazônia (Tabela 1), pois a entrada para o reino consta como Plantae e não há informações para filo, classe ou ordem, o que dificultou a busca de dados.

A diversidade dos fungos do bioma Amazônia está subamostrada nos herbários da região. Os dados das coleções necessitam de informatização e os disponíveis online precisam de serviços de *data cleaning*, normalização, padronização e qualificação por especialistas.

3.2. Herbários da Região Nordeste

O Nordeste tem 37 herbários, assim distribuídos: 12 na Bahia, cinco em Pernambuco e no Ceará, quatro no Maranhão, três no Rio Grande do Norte e em Sergipe, dois na Paraíba e no Piauí, e um em Alagoas. Desses, apenas 14 têm fungos nos acervos. A consulta ao *speciesLink* mostra 114.656 registros, com 552 imagens, disponibilizados online (Tabela 2).

No ALCB os fungos mais representados são Basidiomycota, com as famílias Polyporaceae, Thelephoraceae, Hymenochaetaceae, Auriculariaceae, Corticiaceae e outras. Entre os Ascomycota, a família com mais representantes é Xylariaceae e entre os liquenizados destaca-se Cladoniaceae. O CEPEC tem uma coleção de fungos separada das plantas, onde se destacam pelo número de exemplares as famílias Xylariaceae e Polyporaceae, seguidas por Marasmiaceae e Agaricaceae. No herbário HUEFS há um grande número de fungos anamórficos, sem classificação definida de família (*Inserta Sedis*).

Tabela 2. Herbários do Nordeste com acervo de fungos conforme consta no Index Herbariorum e no *speciesLink*, com número de registros e imagens.

Acronimo	Instituição/Estado	Index Herbariorum	Species Link	Registros	Imagens
ALCB	Universidade Federal da Bahia - BA	Sem menção a fungos	Fungos como filo de Plantae	660	103
CEPEC - Fungi	Centro de Pesquisas do Cacau - BA	Sem menção a fungos	Reino Fungi	2.686	0
HUEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana - BA	Menção a fungos	Reino Fungi	5.876	4
HUNEB	Universidade do estado da Bahia - BA	Sem menção a fungos	Fungi como filo de Plantae	17	0
HUVA	Universidade Estadual Vale do Acaraú - CE	Sem menção a fungos	Não consta no <i>speciesLink</i>	NI	0
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco - PE	Sem menção a fungos	Não mostra os registros de fungos	NI	0
ISE	Universidade Federal de Sergipe - SE	Menção a líquens	Reino Fungi	10.915	0
JPB	Universidade Federal da Paraíba - PB	Sem menção a fungos	Não mostra os registros de fungos	NI	0
MAC	Instituto de Meio Ambiente de Alagoas-AL	Sem menção a fungos	Fungi como Plantae	6	6
SLUI	Universidade Estadual do Maranhão - MA	Menção a fungos	Não tem registro	10	0
TEPB	Universidade Federal do Piauí - PI	Menção a fungos	Não tem registro	NI	0
UFP	Universidade Federal de Pernambuco - PE	Sem menção a fungos	Sem registros online	NI	0
UFRN - Fungi	Universidade Federal do Rio Grande do Norte- RN	Sem menção a fungos	Reino Fungi	3.382	29
URM	Universidade Federal de Pernambuco - PE	Menção a fungos	Reino Fungi	91.104	410
TOTAL				114.656	552

NI = Não informado

Destacam-se ainda representantes de Chaetosphaeriaceae, Beltraniaceae e Polyporaceae. No HUNEB, Tricholomataceae e Polyporaceae são as famílias com maior número de exsiccatas, mas nesse herbário, famílias de plantas e fungos estão juntas, o que dificulta a análise dos dados. O IPA tem uma coleção histórica de fungos, ainda não disponível online. O ISE é especializado, mantendo no acervo apenas fungos liquenizados; Graphidaceae, Trypeteliaceae e Lecanoraceae são as famílias com maior número de representantes. O MAC, em Alagoas, não lista nenhum fungo registrado. No UFP existe uma coleção de Myxomycetes, mas os dados não se encontram disponíveis online. O UFRN tem uma coleção de fungos separada (UFRN-Fungi) das plantas, com mais exemplares de Geastraceae, Agaricaceae, Nidulariaceae e Lycoperdaceae; Marasmiaceae e Phallaceae também estão bem representadas. O URM, exclusivo para fungos, destaca-se por deter o maior e mais diverso acervo do país, com mais de 90.000 exemplares cadastrados, e mais de 700 tipos; os dados encontram-se quase na totalidade disponíveis online. Pucciniaceae, Sphaeropsidaceae, Botryosphaeriaceae e Erysiphaceae têm o maior número de representantes, refletindo as coletas de fungos foliícolas realizadas por Chaves Batista, fundador do herbário, e colaboradores. Ultimamente têm sido mais incrementadas as coleções de Basidiomycota e de Glomeromycota, esta iniciada em anos recentes.

Há um expressivo número de registros de fungos nos herbários do Nordeste e as coleções detêm maior número de espécimes de Ascomycota e Basidiomycota, refletindo as especialidades dos pesquisadores locais.

3.3. Herbários da Região Centro-Oeste

Localizada na porção central do Brasil, a região Centro-Oeste é a segunda maior do país em extensão territorial, atrás apenas da região Norte. Composta pelos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e o Distrito Federal, faz limite com as demais regiões, e é a mais interiorana (Brasil, 2019). O conjunto de características especiais proporciona à região grande variedade de paisagens, distribuídas nos biomas Cerrado, Pantanal e Amazônia, e abrigando uma das mais ricas diversidades biológicas do planeta (Myers *et al.*, 2000; Brasil, 2019). São conhecidas para a região 822 espécies de algas e cianobactérias, 496 briófitas, 394 samambaias e licófitas, 9.329 plantas com sementes e 488 fungos (Menezes *et al.* 2015, GFB, *et al.* 2015, Costa e Peralta 2015, Maia *et al.* 2015, Prado *et al.* 2015).

Foram encontrados 20 herbários na região Centro-Oeste, sendo sete em Mato Grosso, cinco em Goiás, quatro em Mato Grosso do Sul e quatro no Distrito Federal. O herbário PVA foi recentemente desativado, mas foi considerado aqui porque a destinação do acervo ainda é incerta. Todos os herbários, exceto o PVA, que pertence a uma instituição privada, a Universidade de Cuiabá (UNIC), são de instituições públicas (universidades ou instituições de pesquisa) (Tabela 3).

Desses 20, apenas cinco abrigam coleções micológicas relevantes: UB e IBGE, no Distrito Federal; CGMS, no Mato Grosso do Sul; HUEG, em Goiás e PVA, no Mato Grosso. Os demais, ou não contam com exsiccatas de fungos ou possuem menos de 150 amostras (Figura 2, Tabela 3).

O herbário UB, fundado em 1963, é o maior e mais antigo do Centro-Oeste. Conta ainda com uma coleção micológica, conhecida como CMHUB, que é fisicamente isolada da coleção botânica e fica no Departamento de Fitopatologia; as curadorias são distintas e os sistemas de gestão independentes. O acervo micológico, iniciado em 1993, apresenta cerca de 23.500 acessos (aproximadamente 7,3% do total do UB), a maioria resultante de pesquisas liderados pelo Prof. José Carmine Dianese e colaboradores. Dessas amostras, provenientes de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Distrito Federal, Rondônia, Tocantins, Sul do Maranhão e Piauí, e cerca de 2.000 já constam no site (<http://pgbm.unb.br/images/sampleddata/laboratorios/Coleo%20Micologica%20do%20Herbriio%20UB.pdf>). Predominam nessa coleção microfungos fitopatogênicos e algumas centenas de mixomicetos. Representativo da micobiota associada a plantas do Cerrado, incluindo alguns holótipos, o acervo figura como um dos principais na região. Contudo, grande parte desse material ainda não foi identificada, e as informações não constam em nenhuma base de dados virtual.

O herbário IBGE, fundado em 1977, conta com um acervo de cerca de 83.000 acessos, dos quais 2.200 fungos (2,7% do acervo) que ainda não estão catalogados. A partir do desenvolvimento deste trabalho, o material foi concedido por empréstimo ao herbário HUEG, para estudo de especialistas e identificação das espécies.

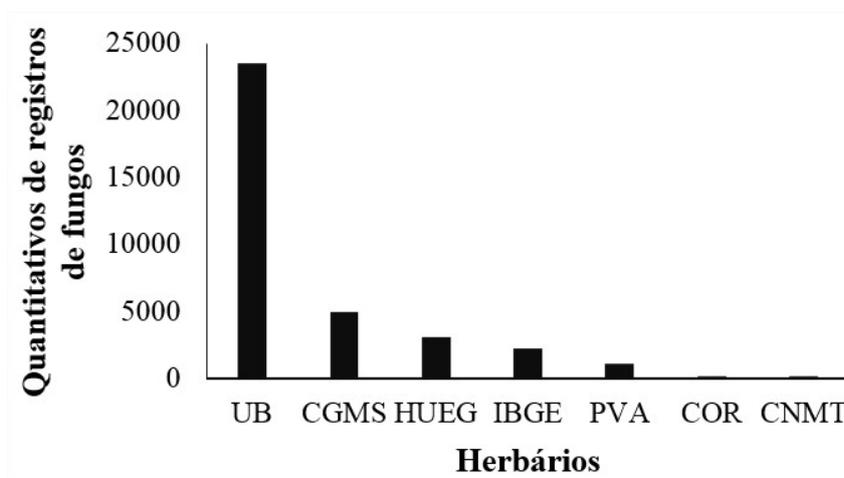
Tabela 3. Herbários da região Centro-Oeste com acervo micológico.

Acrônimo	Nome	Instituição/Estado	Nº acessos		Grupos predominantes
			Geral	Fungos	
IBGE	Herbário da Reserva Ecológica do IBGE	Reserva Ecológica do IBGE – DF	83.000	2.200	Não informado
UB	Herbário da Universidade de Brasília	Universidade de Brasília – DF	323.500	23.500	Micromicetos fitopagotônicos e mixomicetos
HUEG	Herbário da Universidade Estadual de Goiás	Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis – GO	13.500	3.100	Macromicetos (basidiomicetos) e mixomicetos
CGMS	Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande – MS	70.000	4.912	Fungos liquenizados
COR	Herbário COR	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus do Pantanal – MS	17.527	130	Basidiomycetes
PVA	Herbário Primavera do Leste	Universidade de Cuiabá, Unidade de Primavera do Leste – MT	1.930	1.058	Macromicetos (preferencialmente Basidiomicetos)
CNMT	Herbário Centro-Norte Mato-grossense	Universidade Federal de Mato Grosso – MT	8.287	48	Basidiomycota e fungos assexuais

O herbário CGMS, fundado em 1989, conta com cerca de 70.000 registros, dos quais 4.912 são fungos (7% do total). A maioria desse acervo micológico é constituída de fungos liquenizados, provenientes de projetos dos professores Adriano Spielmann e Luciana Canêz. Essa coleção está entre as maiores e mais representativas em líquens no Brasil.

O herbário HUEG foi fundado em 2000. Atualmente conta com cerca de 13.500 registros, dos quais 3.100 representam o acervo micológico (cerca de 23% do total). A coleção é constituída principalmente por macromicetos e mixomicetos representativos de Unidades de Conservação do Cerrado, no estado de Goiás, como o Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, o Parque Estadual da Serra dos Pirineus, o Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, a Floresta Nacional de Silvânia, entre outras, e inclui representantes de fungos poroides, agaricoides, gelatinosos, gasteroides, coprófilos e mixomicetos, o que a torna a principal coleção de macromicetos da região. A quase totalidade desse acervo é fruto de projetos de pesquisa da Prof^a Solange Xavier dos Santos e colaboradores. Somente esse herbário informou contar com programas de divulgação científica e popularização da ciência envolvendo os fungos.

O herbário PVA foi fundado em 2009 e conta com 1.930 registros, dos quais 1.058 são fungos (54% do acervo), predominado os macrobasidiomicetos, originários especialmente do Parque Nacional da Chapada dos Guimarães. Praticamente toda a coleção micológica é fruto do trabalho de um único coletor e determinador das espécies (Alves-Silva, G.).

**Figura 2.** Distribuição dos herbários da região Centro-Oeste e quantitativo de registros dos respectivos acervos micológicos.

Os resultados mostram que cerca de 25% dos herbários da região Centro-Oeste abrigam acervos micológicos, o que significa que a região conta com apenas cinco coleções fúngicas herborizadas, uma em cada estado e duas no Distrito Federal. Contudo, essas coleções representam muito pouco em relação ao acervo geral desses herbários, não chegando a 10% do total de registros/herbário (exceções para o HUEG com 23% e o PVA com 54%). A representatividade dos fungos em relação a todos os registros de fungos nos 20 herbários da região equivale apenas a 4,3%.

3.4. Herbários da Região Sudeste

Os herbários com acervo de fungos na região Sudeste são prioritariamente utilizados para estudos da micota dos estados do Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP), nos seus diversos ambientes e ao longo do tempo. Estão indexados no *Index Herbariorum* e/ou na Rede Brasileira de Herbários, 75 herbários ativos na Região (ES: 5, MG: 21, RJ: 16, SP: 33). A discrepância entre o número de herbários ativos nos Estados da região se deve à diferença em área territorial e a outros fatores, como o número de instituições de ensino e pesquisa. O Rio de Janeiro foi sede da capital do Brasil no período de 1763 a 1960, e por este motivo detém os dois maiores e mais antigos herbários do país (Herbários R, do Museu Nacional, fundado em 1831, e RB, do Jardim Botânico, fundado em 1890).

Do total de herbários da região, 40 fazem parte do INCT-Herbário Virtual da Flora e dos Fungos, disponibilizando dados na plataforma *speciesLink*. Fazem parte do Herbário Virtual-Reflora 15 herbários da região; boa parte dos herbários também integra o Reflora e/ou disponibiliza dados através da plataforma JABOT (Tabela 4).

Dos 75 herbários ativos na região, apenas 20 herbários possuem fungos: dois no Espírito Santo, cinco em Minas Gerais, sete no Rio de Janeiro e seis em São Paulo. Independentemente do número de herbários em cada Estado, o padrão que se verificou foi o mesmo: a maioria (55) não possui fungos no acervo, alguns (3) possuem menos de 20 espécimes, provenientes de coletas esporádicas, oito possuem entre 100 e 1.000 registros e apenas um pequeno grupo (9) tem número mais expressivo de fungos, com mais de 1.000 espécimes (Tabela 5).

No estado do Espírito Santo destaca-se a coleção do Herbário VIES, com 1.075 espécimes de fungos, dos quais 1.004 registros estão *online*; a grande maioria é de políporos.

Os maiores acervos de fungos em Minas Gerais estão nos herbários CESJ e VIC. O primeiro possui 1.874 espécimes (2,64%), na maioria líquens de Minas Gerais. Destaque para as coleções do Parque Nacional do Caparaó, do Parque Estadual do Ibitipoca e de Ponta Grossa (Paraná) que formam grande parte do acervo, sendo em sua maioria coletas do Pe. Leopoldo Krieger. O segundo (VIC) possui apenas 1,5% do total de acervo de fungos, estimado em 10.000 registros, disponível para consulta na plataforma *speciesLink*. As amostras são provenientes, em sua maioria, de expedições científicas realizadas por pesquisadores que lá viveram e, também, do intercâmbio com instituições nacionais e estrangeiras; as coleções mais recentes são oriundas, principalmente, de trabalhos em ecossistemas do estado de Minas Gerais: caatinga, campo rupestre, cerrado e principalmente florestas semidecíduais e ombrófilas, incluídas no domínio da Floresta Atlântica.

No Estado do Rio de Janeiro destacam-se os maiores e mais antigos herbários do país (R e RB), além da Coleção Científica e Herbário Fitopatológico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Herbário UFRJ). Apesar de constituir o maior herbário do Brasil, a coleção de fungos corresponde a menos de 1% do acervo do Herbário R (Tabela 5). Está incluída na coleção de criptógamos (cadastrada no *speciesLink* como R-Criptógamos), que reúne coletas realizadas, principalmente, por naturalistas estrangeiros durante o século XIX, como E. Ule, P. Dusén, P. von Luetzelburg, G.O.A. Malme, A. Sehnem, J. Vattimo, T.W.N. Becket, A. Puttemans, dentre outros. Atualmente, o acervo de criptógamos do herbário R está em processo de informatização com cerca de 12.573 registros *online*.

O herbário RB, do Jardim Botânico, é um dos mais completos da região e o maior do país. Além das exsiccatas, fazem parte do acervo a xiloteca, a carpoteca, a coleção em meio líquido, os bancos de DNA e de sementes, a coleção de cultura de fungos e a coleção etnobotânica. Com 13.457 registros de fungos (5.334 Basidiomycota e 6.298 Ascomycota), e cerca de 100 espécimes-tipo, principalmente líquens da coleção de Fée, a coleção de fungos corresponde aproximadamente a 1,7% do acervo.

Com cerca de 15.000 fungos, a Coleção Científica e Herbário Fitopatológico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRJ), possui grande importância histórica e científica englobando, por exemplo, as coleções do

Tabela 4. Número de herbários da região Sudeste cadastrados no Index Herbariorum (Index), na Rede Brasileira de Herbários (Rede), que fazem parte do INCT-Herbário Virtual da Flora e dos Fungos e disponibilizam dados na plataforma *speciesLink* (Splink), ou integram o REFLORA, disponibilizando dados na plataforma JABOT.

Estado	Index	Rede	INCT/ Splink	Reflora	JABOT	Herbários
ES	5	3	4	2	2	5
MG	13	20	12	2	2	21
RJ	12	15	7	5	11	16
SP	23	30	17	6	4	33
TOTAL	53	68	40	15	19	75

Tabela 5. Herbários da Região Sudeste com acervo de fungos (número total de espécimes e de fungos).

Herbário (ano da fundação)	Acervo Total	Acervo de Fungos	Instituição/Estado
AFR (2013)	3.700	200	Fundação Jardim Botânico de Poços de Caldas, MG
BHCB (1968)	190.000	283	Universidade Federal de Minas Gerais, MG
BOTU (1966)	4.388	500; 88 <i>online</i> 10 gêneros	Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP
CESJ (1941)	71.000	1.874	Universidade Federal de Juiz de Fora, MG
HPUC-MG (2009)	7.339	365	Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, MG
HUNI (1998)	6.435	5	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, RJ
IACM (1932)	8.250	8.250 (A.P. Viégas, J. Rick)	Herbário Micológico, Instituto Agrônomo, SP
IBI (1931)	13.000	13.000 Uredinales	Instituto Biológico, SP
IFSR (2011)	510	17	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, SP
MBML (1949)	54.071	165	Instituto Nacional da Mata Atlântica, ES
R (1831)	600.000	4.552	Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ
RB (1890)	780.000	13.457	Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ
RBR (1916)	45.000	9	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ
RFA (1953)	43.128	611	Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ
RFFP (1997)	17.200	250	Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ
SJRP (1977)	30.000	490 (439 <i>online</i>) 157 políporos	UNESP, Campus São José Rio Preto, SP
SP (1917)	500.000	40.000 (25.589 <i>online</i>)	Instituto de Botânica, SP
UFRJ (1916)	30.000	15.000	Coleção Científica e Herbário Fitopatológico, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ
VIC (1930)	54.000	10.000	Universidade Federal de Viçosa, MG
VIES (1991)	40.962	1.075	Universidade Federal do Espírito Santo, ES

Ministério da Agricultura, a coleção particular do A. Puttemans e a coleção de C.L. Spagazzini formada principalmente por coletas de J.I. Puiggari. Está em fase de informatização e limpeza dos dados, mas sem registros online.

Na região Sudeste está localizado a segunda maior coleção de fungos no Brasil, a do Herbário SP, do Instituto de Botânica, em São Paulo. Com um acervo de cerca de 500.000 exsiccatas, o SP possui cerca de 40.000 exemplares de fungos e 400 espécimes-tipo, principalmente basidiomicetos e fungos liquenizados das ordens Agaricales, Hymenochaetales, Lecanorales e Polyporales (Figura 3). Ainda assim, há grandes lacunas a serem preenchidas, uma vez que 77% destes registros pertencem a apenas 20 famílias, sendo Polyporaceae (23%) e Parmeliaceae (15,7%) as mais representativas, reflexo da falta de especialistas para os demais grupos na instituição.

Além deste herbário, estão localizados no estado de São Paulo outros dois herbários com coleções significativas de fungos: IBI (Instituto Biológico), com acervo de cerca de 13.000 Pucciniales, e IACM (Herbário Micológico do Instituto Agrônomo de Campinas), o qual possui cerca de 8.250 espécimes, sobretudo coletas de A.P. Viégas e J. Rick.

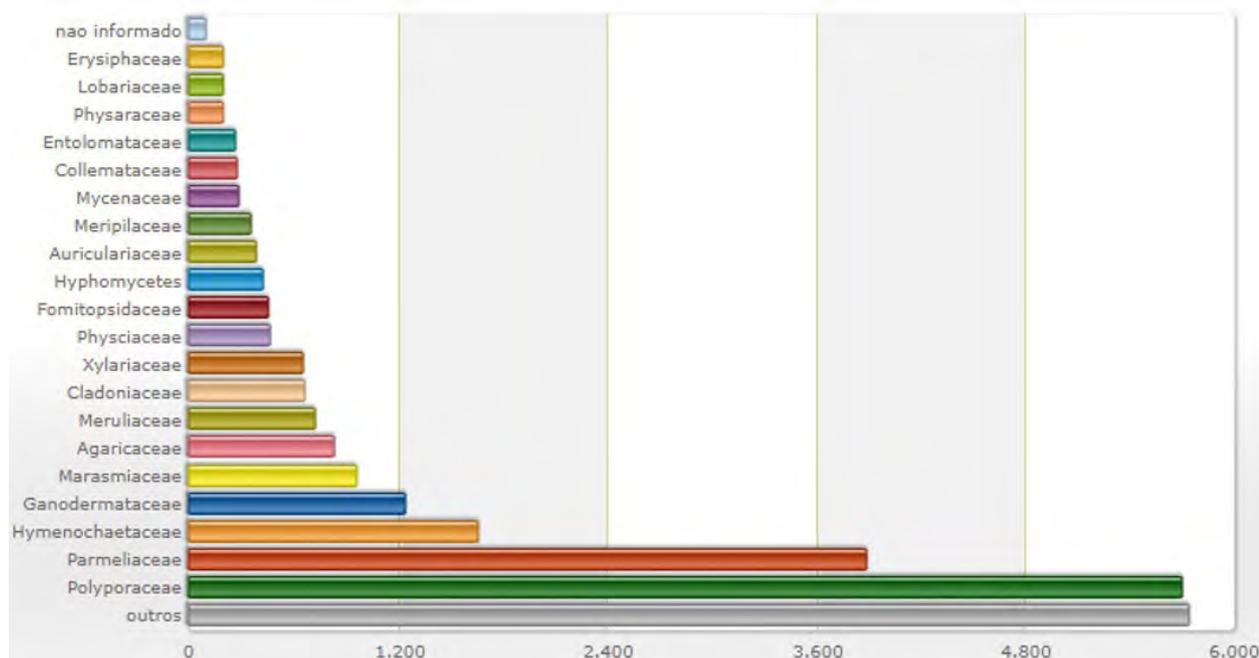


Figura 3. Número de espécimes das famílias de fungos mais representadas no Herbário SP, do Instituto de Botânica. Fonte: speciesLink (<http://splink.cria.org.br>).

3.5. Herbários da Região Sul

Na Região Sul do Brasil, com os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, seis herbários se destacam por seu acervo micológico, dois em cada Estado (Tabela 6, Figura 4). No Rio Grande do Sul, o herbário histórico PACA, onde está depositada a coleção Fungi Rickiani (11.489 espécimes e 470 tipos) e o herbário ICN, com cerca de 15.000 espécimes de fungos e líquens são os principais. O Herbarium Anchieta foi fundado em 1932, no Colégio Anchieta, por Balduino Rambo, daí a sigla PACA (Porto Alegre, Colégio Anchieta). Atualmente, encontra-se no Instituto Anchietano de Pesquisa/UNISINOS, São Leopoldo, RS. Conta com aproximadamente 140.000 exemplares abrigando as coleções históricas e científicas de B. Rambo (*Flora Brasiliae Australis - Angiospermas*), a coleção de A. Sehnem (*Plantas do sul do Brasil - Pteridófitas e Briófitas*), a coleção de J. E. Rick, considerado o pai da micologia brasileira (*Fungi Rickiani - Fungos*), sendo esta uma das maiores coleções da América Latina, a coleção de Tipos nomenclaturais e coletas de pesquisadores associados. O Herbário ICN, fundado em 1937 por Alarich Schultz, conta com cerca de 200.000 exemplares, onde predominam as Angiospermas, mas também abriga coleções de Algas, Fungos, Briófitas e Pteridófitas. O acervo de fungos é oriundo principalmente das teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS.

Em Santa Catarina, o herbário FLOR, com 8.500 espécimes e o herbário FURB, com 1.474 espécimes são as principais coleções micológicas do Estado. O Herbário FLOR foi fundado em 1964 pelos professores Ranulpho José de Souza Sobrinho e Roberto Miguel Klein e o acervo compreende 61.900 exemplares de plantas vasculares, fungos e algas. É o segundo maior do Estado e está voltado especialmente para a flora do estado de Santa Catarina. O herbário FURB criado em 1990 por Lucia Sevegnani, foi denominado Dr. Roberto Miguel Klein em homenagem ao botânico e ecólogo que estudou a flora de Santa Catarina, e foi professor da FURB. O herbário tem atualmente 60.000 registros, com destaque para plantas vasculares, licófitas e samambaias do Sul do Brasil.

No Paraná, o herbário MBM, onde está depositada a coleção do naturalista A. de Meijer, e o herbário UPCB, com cerca de 4.700 espécimes de fungos, a maioria liquenizados, são os principais acervos micológicos do Paraná. O acervo do MBM tem 412.000 amostras, sendo um dos maiores herbários do país e o maior da flora sul brasileira. Anualmente, o acervo é incrementado em cerca de 15.000 novos espécimes. O acervo do Herbário UPCB conta hoje com 91.572 amostras de Angiospermas, Gimnospermas, Pteridófitas, Briófitas, Fungos e Algas. Possui maior ênfase na Flora do Paraná, mas tem coletas de outros Estados e do exterior. É a segunda maior coleção do Estado.

O acervo micológico nos herbários da região Sul ainda é pequeno quando comparado ao acervo de plantas, principalmente vasculares (Tabela 6).

Nos estudos taxonômicos a análise do material tipo é fundamental para a identificação das espécies. A maior coleção de tipos da Região Sul do Brasil está depositada no Herbário PACA. A coleção *Fungi Rickiani* inclui quase 500 tipos de espécies de fungos, coletados por J. Rick. Os Herbários FLOR e ICN também abrigam tipos de fungos.

Dois herbários se destacam pelo seu acervo de fungos liquenizados, os Herbários ICN e o UPCB. No ICN, a coleção de fungos liquenizados é oriundo principalmente de coletas da liquenóloga Mariana Fleig e de material de teses de doutorado de alunos do PPG Botânica da UFRGS. O acervo de fungos do UPCB é formado quase que exclusivamente por fungos liquenizados, de coletas resultantes de dissertações de mestrado do PPG de Botânica da UFPR.

Três herbários se destacam pelo acervo de fungos não liquenizados, os Herbários FLOR, PACA e ICN. As coleções do FLOR e do ICN são resultado de teses e dissertações dos Programas de Pós-Graduação da UFSC e da UFRGS, respectivamente. O Herbário MBM também se destacaria no acervo de fungos não liquenizados se a coleção do naturalista holandês André De meijer, com aproximadamente 5.000 fungos, já estivesse informatizada.

Tabela 6. Acervo de herbários com fungos na Região Sul.

Herbário/ fundação	Instituição/ Estado	Total Espécimes	Fungos/Líquens	Curador Adj. Fungos
PACA (1932)	Instituto Anchieta - RS	142.000	11.489	não
ICN (1937)	Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS	200.000	13.000 (+ 2.000)	sim
FLOR (1964)	Universidade Federal de Santa Catarina - SC	61.900	8.500	sim
FURB (1990)	Universidade Regional de Blumenau - SC	60.000	1.474	não
UPCB (1952)	Universidade Federal do Paraná - PR	91.572	4.747	não
MBM (1965)	Museu Botânico Municipal - PR	412.000	2.060 (+ 5.000)	não

Obs.: Números entre parênteses referem-se a coleções ainda não informatizadas.

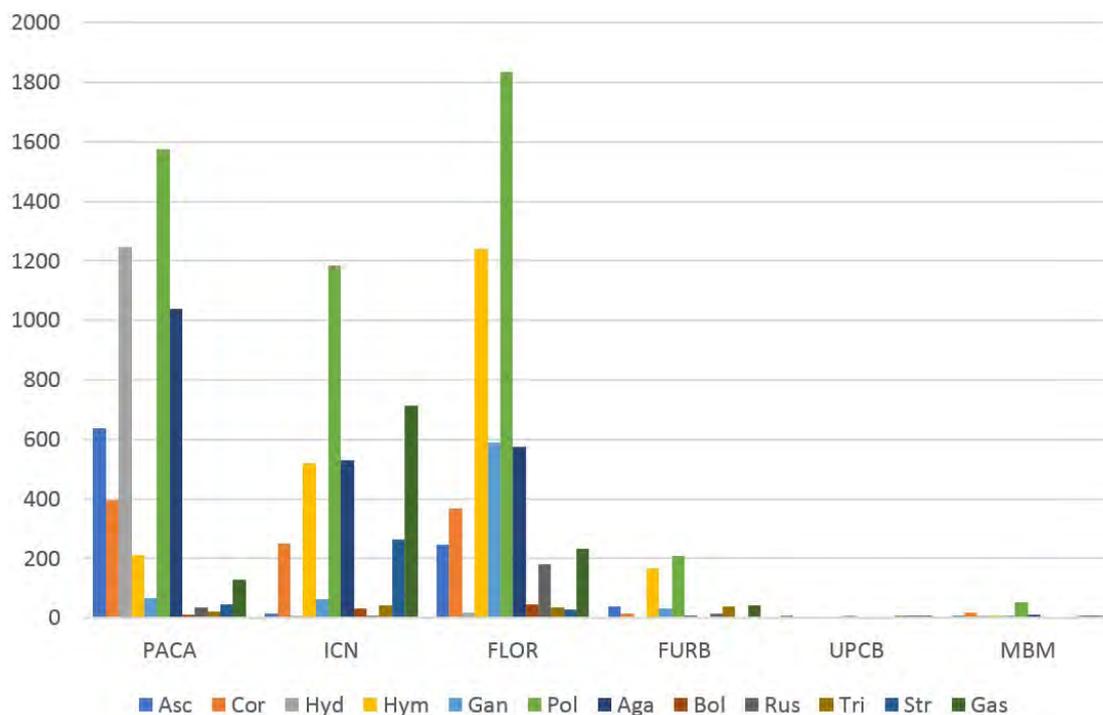


Figura 4. Principais grupos de fungos no acervo de herbários da região Sul: Ascomycota, Corticioides, Hydnaceae, Hymenochaetaeae, Ganodermataceae, Polyporaceae, Agaricaceae, Boletaceae, Russulaceae, Tricholomataceae, Strophariaceae e Gasteroides.

4. Considerações gerais

Entre os principais problemas enfrentados na compilação dos dados para este trabalho destacam-se a falta de informatização dos acervos com a respectiva disponibilização dos dados, e a não indicação dos dados de fungos no reino correspondente (Fungi), fazendo com que fiquem inseridos entre os registros do reino Plantae.

Muitas vezes, a descrição sumária do herbário, nas bases virtuais, relata apenas a coleção botânica, não informando sobre a presença de fungos, ou ainda mixomicetos, embora, ao se consultar a composição do acervo, seja possível encontrar exemplares desses grupos. Da mesma forma, o sistema de busca nas bases, ou o modo como essas coleções são catalogadas também dificulta o resgate dos registros, ou por não haver filtros específicos para fungos, fungos liquenizados ou mixomicetos, ou porque o material não foi catalogado no reino Fungi, de modo que esses acessos só são recuperados ao se pesquisar por táxons inferiores, como família, espécie ou, então, pelo coletor. Essa situação indica que os fungos ocupam papel secundário na maioria das coleções, tanto em relação à quantidade de amostras, como nos sistemas de catalogação e reconhecimento. Exceções são os herbários com coleções apenas micológicas (HJP, ISE e URM) e aqueles com coleções de fungos separadas e/ou devidamente identificadas no reino.

Em geral, a expressividade do acervo micológico é proporcional à idade do herbário, com algumas exceções, como o herbário IBGE, que apesar de ser o segundo mais antigo no Centro-Oeste, é o penúltimo em número de registros de fungos, o que decorre da coleção não ser alimentada já há algum tempo. Isso remete a outro fator ainda mais contundente, que é a ausência de especialistas em fungos nos herbários. Somente aqueles que contam com micólogos na equipe têm a coleção ampliada, em geral com prioridade para os grupos de interesse desses profissionais. Isso reforça a necessidade de micólogos entre as equipes dos herbários para que os fungos sejam devidamente contemplados nos acervos e possam melhor representar a micobiota nacional. As diferenças significativas no número de registros entre os herbários de cada região e entre os de outras regiões, provavelmente estão relacionados a um histórico da existência, ou não, de especialistas em micologia ou fitopatologia, lotados nas instituições que detém os acervos. Além disso, podem refletir a ocorrência de visitas de especialistas, em projetos vinculados aos herbários, com possível incremento de coletas e identificações. Também se destaca como importante fonte de coletas e registros de fungos nos herbários, a existência de programas de pós-graduação que contemplem a área de Micologia, fomentando as coleções, assim como a formação de pessoal e divulgação do conhecimento da micobiota do Brasil.

De modo geral, os curadores consultados para este trabalho citam como principais problemas para ampliação, conservação e informatização das coleções de fungos a falta de investimento financeiro, a infraestrutura dos herbários, a insuficiência de recursos humanos e a ausência de micólogos, na instituição, envolvidos diretamente com a coleção.

O gerenciamento dos acervos de fungos com curadorias ou vice-curadorias por micólogos, visando primeiramente a preservação do acervo e o incremento da coleção, propicia o treinamento de técnicos e estudantes em práticas específicas de conservação para os diferentes tipos de fungos e a formação de pessoal para informatização e divulgação dos dados em rede, favorecendo a preservação e salvaguarda dos espécimes nas coleções micológicas.

Os dados apresentados indicam que o número de registros nos herbários é subestimado, considerando a falta de informação disponível e a não atualização frequente das informações nas bases de dados. Esses fatores constituem empecilhos importantes para melhor conhecimento sobre os fungos herborizados em acervos nacionais, refletindo na disponibilidade de dados sobre a diversidade micológica no país. Outra observação importante é a ausência, na grande maioria das coleções, da disponibilização de imagens das exsicatas, o que seria de suma importância para dar mais visibilidade ao acervo e facilitar o estudo por especialistas, agregando mais valor às informações.

O incremento dos acervos de fungos nos herbários do país é um grande desafio que deve levar em conta diversos fatores, como estimular a formulação de políticas públicas de valorização das coleções e de estudos sobre diversidade, com a formação e fixação de recursos humanos especializados em micologia.

Agradecimentos

Aos curadores e técnicos consultados que gentilmente forneceram as informações solicitadas. Ao CNPq, CAPES, FACEPE, pelo apoio financeiro a projetos de curadores dos herbários. Agradecimentos especiais a essas agências pelo apoio ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. Os autores também agradecem à Capes, pela bolsa de doutorado concedida a L. Leonardo-Silva e à FAPEG, pela bolsa de mestrado concedida à I. C. Moreira. Ao doutorando Genivaldo A. da Silva (UFRGS) pela colaboração.

5. Referências

- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Desenvolvimento do Centro-Oeste. Disponível em: <http://www.sudeco.gov.br/a-regiao-centro-oeste>. Acesso em 17 de abril de 2019.
- BFG - The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. 2015. *Rodriguésia* 66 (4): 1085-1113.
- Costa, D. P., Peralta, D. F. (2015). Bryophytes diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66 (4): 1–9.
- CRIA. 2019. Centro de Referência e Informação Ambiental. Specieslink [online]. Disponível em: <<http://www.splink.org.br/index>>. Acesso em: 21 de abril de 2019.
- FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. 2019. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 23 de abril de 2019.
- Gasper, A. L., Vieira, A. O. S. 2015. Herbários do Brasil. *Unisanta Bioscience* 4(6): 1–11.
- GBIF - Global Biodiversity Information Facility. 2019. Disponível em: gbif.org. Acesso em: 01 de maio de 2019.
- Hawksworth D.L., Lücking R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectrum* 5(4): 0052-2016.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados.html>. Acesso em 17 de abril de 2019.
- Index Fungorum. 2019. Disponível em: www.indexfungorum.org. Acesso em: 10 de maio de 2019.
- Index Herbariorum. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>. Acesso em: 11 de abril de 2019.
- INCT-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. Disponível em: <http://inct.splink.org.br>. Acesso em: 01 de maio de 2019.
- JABOT. Sistema de Gerenciamento de Coleções Botânicas. Disponível em www.jabot.jbrj.org.br. Acesso em: 01 de maio de 2019
- Maia, L. C., Carvalho Júnior A.A.C., Cavalcanti L.H., Gugliotta A.M., Drechsler-Santos E.R., Santiago A.L.M., Cáceres M.E.S., Gibertoni T.B., Aptroot A., Giachini A.J., Soares A.M.S., Silva A.C.G., Magnago A.C., Goto B.T., Lira C.R.S., Montoya C.A.S., Pires-Zottarelli C.L.A., Silva D.K.A., Soares D.J., Rezende D.H.C., Luz E.D.M.N., Gumboski E.L., Wartchow F., Karstedt F., Freire F.M., Coutinho F.P., Melo G.S.N., Sotão H.M.P., Baseia I.G., Pereira J., Oliveira J.J.S., Souza J.F., Bezerra J.L., Neta L.S.A., Pfenning L.H., Gusmão L.F.P., Neves M.A., Capelari M., Jaeger M.C.W., Pulgarín M.P., Menolli Junior N., Medeiros P.S., Friedrich R.C.S., Chikowski R.S., Pires R.M., Melo R.F., Silveira R.M.B., Urrea-Valencia S., Cortez V.G., Silva V.F. 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia*, 66 (4): 1033 – 1045.
- Menezes, M., Bicudo C.E.M., Moura C.W.N. 2015. Update of the Brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria. *Rodriguésia*, 66 (4): 1047-1062.
- MPEG – Museu Paraense Emílio Goeldi. 2019. Disponível em: <https://www.museu-goeldi.br/assuntos/colecoes/biologicas/botanica/herbario-mg>. Acesso em: 11 de abril de 2019
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853–858.
- PGBM - Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana. 2019. <http://www.pgbm.unb.br/images/sampledatalaboratorios/Coleo%20Micolgica%20do%20Herbrario%20UB.pdf>. Acesso em: 09 de abril de 2019.
- Prado, J., Sylvestre L.S., Labiak P.H., Windisch P.G., Salino A., Barros I.C.L., Hirai R.Y., Almeida T.E., Santiago A.C.P., Kieling-Rubio M.A., Pereira A.F.N., Øllgaard B., Ramos C.G.V., Mickel J.T., Dittrich V.A.O., Mynssen C.M., Schwartsburd P.B., Condack J.P.S., Pereira J.B.S., Matos E.B. 2015. Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. *Rodriguésia*, 66 (4): 1073-1083.
- REFLORA- Herbário Virtual. Disponível em: <http://herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>. Acesso em: 11 de abril de 2019.
- RBH - Rede Brasileira de Herbários. Disponível em: <https://sites.google.com/view/redebrasileiradeherbarios/catálogo>. Acesso em: 11 de abril de 2019.
- SIBBr. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. Disponível em: www.sibbr.gov.br. Acesso em: 01 de maio de 2019.
- Viana, P.L., Ilkiu-Borges, A.L., Sotão, H.M.P. Herbário João Murça Pires, Pará (MG). *Unisanta Bioscience* 4(6), 77–81, 2015.

Fungos fitopatogênicos na Amazônia

SCHURT, Daniel Augusto¹; GASPAROTTO, Luadir.²; PEREIRA, José Clério Rezende.³

¹ Embrapa Roraima

² Embrapa Amazônia Ocidental

³ *In memoriam*

Emails: daniel.schurt@embrapa.br, luadir.gasparotto@embrapa.br

Resumo

A literatura está repleta de exemplos de patógenos devastadores que têm inviabilizado a exploração comercial de várias culturas na região Amazônica, se mediadas de controle não forem adotadas. O exemplo clássico é o *Microcyclus ulei*, agente causal do mal-das-folhas, responsável pelo fracasso de todas as tentativas de cultivo da seringueira na Amazônia sempre úmida, realizadas desde a década de 1920 até 2005, quando foram concluídas as pesquisas com enxertia de copa, técnica que viabiliza a exploração comercial da seringueira nessa Região. Há uma série de patógenos extremamente severos: os que afetam o sistema radicular, induzindo murcha vascular ou podridão; os da parte aérea causadores de desfolhamentos sucessivos, seca descendente dos galhos, e até a morte das plantas e os que afetam frutos e amêndoas. As doenças radiculares, causam altos prejuízos; pois na maioria das vezes não há medidas eficientes para controlar os patógenos, como as fusarioses do maracujá, da pimenta-do-reino, do dendezeiro e da bananeira, induzidas, respectivamente, por *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f.sp. *piperis*, *F. oxysporum* f.sp. *elaedis* e *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Entre os patógenos da parte aérea, além do *M. ulei*, destacam-se o *Thanatephorus cucumeris* afetando dezenas de espécies, como a seringueira, citros, mogno, feijoeiro e soja, *Sclerotium coffeicola*, causador de manchas foliares e desfolhamento em diversas fruteiras, *Mycosphaerella fijiensis* em bananeira e *Moniliophora perniciosa* em cacauzeiro e cupuaçuzeiro. Os frutos são afetados por diversas espécies de *Colletotrichum* spp. As castanhas-da-Amazônia, sofrem grande incidência de fungos aflatoxigênicos, notadamente *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, ocasionando frequentemente o rechaço de cargas de castanhas quando exportadas a outros países. Recentemente, foi identificado *Fusarium chlamydosporum*, em grãos de arroz, um fungo produtor de micotoxinas. Pesquisas e a divulgação científicas precisam ser investidas para que os prejuízos causados por estes patógenos sejam reduzidos melhorando a qualidade dos alimentos.

Palavras-chave: Doenças de plantas, Fungos, Prejuízos Econômicos.

1. Introdução

Um dos problemas que colocam em risco e comprometem a sustentabilidade dos sistemas agrícolas na Amazônia é a ocorrência de doenças. A presença desses agentes bióticos danosos, do ponto de vista econômico, tem sido favorecida por dois fatores básicos: condições climáticas que possibilitam a continuidade dos ciclos biológicos e adoção de práticas agrícolas que vulnerabilizam os cultivos.

O estudo das doenças associadas às plantas cultivadas na Amazônia está intimamente relacionado à história de ocupação dessa região. Até o final da década de 1960, poucas foram as experiências com monocultivos de média e larga escala. Predominava a atividade extrativista de produtos madeireiros e não madeireiros, convivendo com uma agricultura de baixo uso de insumos, caracterizada por pequenas roças e quintais agroflorestais.

A partir da década de 1970, com o surgimento dos grandes projetos agropecuários, começaram a surgir problemas fitopatológicos de maior magnitude, agravando, assim, os processos de alteração e degradação dos agroecossistemas.

Apesar de existirem pesquisas, na região Amazônica, com doenças de plantas, são poucos os trabalhos comparados com as demais regiões do Brasil. Diversos são os motivos, mas o baixo número de fitopatologistas na região Norte é um dos principais agravantes.

A seguir será apresentada breve descrição das principais doenças, causadas por fungos, de importância econômica, quanto aos aspectos morfológicos e biológicos.

Seringueira (*Hevea brasiliensis* Willd. ex A.Juss.)

Mal das folhas: causado pelo fungo *Microcyclus ulei* (Henn.) v. Arx (anamorfo: *Fusicladium macrosporum* J. Kuijper), é a doença mais séria da cultura, constituindo-se no fator limitante para o estabelecimento de seringais na região Amazônica (Hora Junior *et al.*, 2014). O patógeno infecta folíolos jovens com até 10 a 12 dias de idade, causando a queda prematura das folhas. Causa desfolhamento, durante todo o ano, em viveiros, jardins clonais e seringais jovens, que ainda não apresentam senescência anual, e em plantios adultos na época do enfolhamento. Em seringais adultos, ataques sucessivos do fungo causam morte-descendente dos ramos e até das plantas (Gasparotto *et al.*, 2012). A manifestação dos sintomas da doença depende principalmente da idade dos folíolos e da suscetibilidade clonal. Segundo Gasparotto *et al.* (2012), em folíolos jovens de clones suscetíveis, observam-se lesões levemente escurecidas e irregulares, que provocam deformação e enrugamento especialmente na face abaxial do limbo. Essas lesões passam a apresentar tonalidade e aspecto verde-oliva-feltroso ou escuro-feltroso, como resultado da esporulação conidial do fungo. Quando as lesões ocorrem em número elevado, estas coalescem, resultando no sintoma de queima dos folíolos, que também caem, posteriormente. Os folíolos que sofrem apenas leves infecções ou que foram infectados após os 12 dias de idade até o início da maturação permanecem nas plantas; e, quando maduros, suas áreas lesionadas exibem, especialmente na superfície superior do limbo, o sintoma de lixa resultante da produção de estromas negros dispostos circularmente.

Mancha-areolada: causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (anamorfo: *Rhizoctonia solani* Kuhn), provoca lesões em folíolos jovens que acarretam a queda prematura das folhas. Em condições de alta umidade, pode causar prejuízos semelhantes ao *M. ulei* (Gasparotto *et al.*, 2012). Os folíolos com cerca de 12 a 15 dias de idade são suscetíveis ao patógeno. Nestes, as lesões têm 3 mm a 10 mm de diâmetro. Inicialmente as lesões são aquosas e apresentam exsudação de látex na superfície abaxial. As gotas de látex coagulam e oxidam, formando pontos negros de aspecto oleoso. Dois a três dias após, a lesão apresenta aspecto seco, coloração castanha e circundada por um halo clorótico. De modo geral, as manchas são grandes e quando localizadas no terço basal ou próximo à nervura principal do folíolo. O fungo induz o desfolhamento precoce. Em folíolo no chão, em condições de alta umidade, observa-se sobre as manchas um manto micelial esbranquiçado do patógeno (Gasparotto *et al.*, 2012).

Crosta-negra: causada pelo fungo *Phyllachora huberi* Henn. O fungo *Rosenscheldiella hevea* Junq. & Bezerra foi descrito associado às lesões causadas por *P. huberi*, (Junqueira & Bezerra, 1990). Esses patógenos têm sido relatados somente em seringueira. É uma doença comum em seringais adultos, a qual afeta a folhagem madura podendo causar desfolhas. Os sintomas ocorrem na superfície abaxial dos folíolos, inicialmente como placas circulares negras, que com o passar do tempo ressecam provocando a ruptura de suas porções ao longo das nervuras secundárias, resultando em sintomas tardios caracterizados por uma porção estromática escura no centro, circundada por áreas verdes amareladas do limbo. Na superfície adaxial, os sintomas apresentam-se como áreas ou lesões amareladas, correspondentes aos estromas na fase inferior do limbo. Os estromas de *P. huberi* podem estar associados aos estromas de *R. heveae*. Esses dois fungos são facilmente distinguidos em microscópio, devido às características dos ascos e ascósporos (Gasparotto *et al.*, 2012).

Bananeira (*Musa* spp.)

Sigatoka-negra: causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. (anamorfo: *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), é a doença mais importante na maioria das regiões produtoras de banana e plátanos do mundo. No Brasil, a doença foi identificada em fevereiro de 1998 nos municípios de Tabatinga e Benjamim Constant, no estado do Amazonas, na fronteira do Brasil com a Colômbia e o Peru (Pereira *et al.*, 1998). O patógeno causa a morte das folhas e inviabiliza a produção das cultivares suscetíveis, se medidas de controle não forem adotadas. Os sintomas são inicialmente observados na face abaxial, predominantemente na extremidade lateral do limbo, do lado esquerdo da folha, nas folhas 1 ou 2, por pequenas pontuações claras ou áreas des-pigmentadas, que progridem formando estrias marrom-claras, que podem atingir de 2 mm a 3 mm de comprimento. Com o progresso da doença, as estrias expandem radial e longitudinalmente e, ainda com coloração marrom clara, podem ser visualizadas na face adaxial, podendo atingir até 3 cm de comprimento. Nos estádios finais da doença, as lesões apresentam-se com o centro deprimido e de cor branco-palha. As lesões apresentam um halo interno proeminente marrom-escuro, circundado por um pequeno halo amarelo. No centro das lesões,

eventualmente, pode-se visualizar pontuações escuras representadas pelas frutificações do patógeno. As lesões coalescem e causam o secamento de todo o limbo foliar (Gasparotto *et al.*, 2006).

Mal do Panamá: causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (E.F.Sm.) Snyder & Hansen, é uma doença endêmica e ocorre em todas as regiões produtoras de banana do mundo. Quando afeta cultivares altamente suscetíveis, como a banana cv. Maçã, provoca perdas de 100% na produção. Já nas cultivares tipo Prata, que apresentam grau de suscetibilidade bem menor do que a “Maçã”, a incidência do mal-do-panamá, geralmente, situa-se num patamar de 20% de perdas. As plantas infectadas exibem externamente amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos do limbo foliar e progredindo no sentido da nervura principal. Posteriormente, as folhas murcham, secam e se quebram junto ao pseudocaulo, por consequência ficam pendentes, o que confere à planta a aparência de um guarda-chuva fechado. É comum constatar-se que as folhas centrais das bananeiras permanecem eretas mesmo após a morte das mais velhas, e que próximo ao solo ocorrem rachaduras do feixe de bainhas, cuja extensão varia com a área afetada no rizoma. Internamente, observa-se descoloração pardo-avermelhada na parte mais externa do pseudocaulo provocada pela presença do patógeno nos vasos (Gasparotto *et al.*, 2016).

Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth)

Antracnose: o agente causal dessa doença é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. A enfermidade afeta folhas de plantas enviveiradas estressadas por falta d'água ou de nutrientes e frutos em plantios em produção. As manchas foliares são irregulares, com margens definidas, iniciando-se normalmente nas bordas do limbo e progredindo em direção à nervura central. As manchas, após a necrose dos tecidos, apresentam-se secas, com o centro esbranquiçado, contornado por um halo estreito marrom-avermelhado e com os tecidos adjacentes, aparentemente saudáveis, amarelados. Quando o ataque é severo em plantas jovens, pode causar seca total das folhas e morte das mesmas. Os frutos afetados apresentam enrugamento e mudança na textura e cor da epiderme, para tons mais claros seguido de enegrecimento. As lesões são deprimidas e recobertas por uma massa de esporos de coloração rósea. Os ferimentos causados por pássaros e insetos facilitam a incidência da doença que, em alguns casos, tem atingido até 10% dos frutos (Gasparotto & Pereira, 2016).

Podridão do estipe: causada pelo fungo *Phytophthora palmivora* Butler, induz perdas de até 30% das mudas enviveiradas e plantas adultas. Os sintomas caracterizam-se pelo amarelecimento da primeira e da segunda folha aberta e da folha bandeira ou vela (folha não aberta). Em seguida, pode ocorrer o amarelecimento e a seca das demais folhas, podendo provocar a morte da planta-mãe e, às vezes, dos perfilhos e de toda a touceira. Ao se realizar cortes longitudinais e transversais no estipe da pupunheira, observa-se o escurecimento dos tecidos internos e uma podridão generalizada.

Laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.)

Gomose: causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Dastur e *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian, é uma das principais doenças fúngicas dos citros no Brasil, ocorrendo em todas as regiões produtoras. Os patógenos atacam tanto mudas no viveiro como plantas adultas, na região do colo das plantas, acima ou abaixo da superfície do solo. Os sintomas apresentam-se como áreas mortas na casca do caule, com lesões deprimidas de cor escura. Ocorre exsudação de goma (ou resina) na área afetada, ressecamento e fendilhamento longitudinal da casca. Internamente, os tecidos apresentam-se de coloração amarela e mais tarde tornam-se pardacentos. Pode ocorrer a formação de calo cicatricial na periferia das lesões. Quando a lesão circunda o tronco por completo, a planta morre. Na parte aérea, nota-se a clorose intensa das folhas correspondente ao lado do tronco ou das raízes onde ocorrem as lesões, murcha, queda de folhas e morte da planta (Gasparotto *et al.*, 1998).

Pinta preta: causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, é uma das principais doenças fúngicas dos citros, devido aos altos custos para seu controle e aos danos causados principalmente nos frutos. Causa lesões sobre a casca do fruto, tornando-o com má aparência para as vendas, mas raramente ocorre deterioração da fruta, ainda que a casca se torne extensivamente necrótica (Kotzé, 1981). Nos casos de alta severidade da doença, há queda precoce dos frutos antes de completarem a maturação. A doença manifesta-se de diversas formas nos frutos, sendo relatados seis tipos de sintomas; mancha-prata ou mancha-dura é a mais típica e aparece quando os

frutos estão amadurecendo. Apresenta bordas salientes com depressão no centro, cor clara com pontos escuros, chamados de picnídios, onde os picnidiósporos são formados.

Mogno-africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.)

Mancha areolada: causada pelo fungo *T. cucumeris*, foi descrita ocorrendo em viveiros e em plantios definitivos em Manaus, AM, e Igarapé-Açu, PA, causando lesões em folhas maduras e queda de folhas jovens (Gasparotto *et al.*, 2001). Os sintomas ocorrem em folhas jovens através de manchas marrons com 2 mm a 8 mm de diâmetro, centro esbranquiçado, bordos escuros e circundados por um halo cor de vinho. Em folhas maduras, as manchas são grandes, marrom-claras ou marrom-escuras, descontínuas, necróticas e em forma de auréolas, que tendem a cair. Em folíolos caídos no chão é possível observar um manto micelial esbranquiçado na superfície de lesões situadas na face abaxial das folhas.

Mancha - concêntrica: causada pelo fungo *Sclerotium coffeicola* (Stahel) Bull. O patógeno, fungo habitante do solo, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, é polífago, agressivo e que, além do mogno-africano, afeta dezenas de espécies cultivadas, notadamente plantas arbustivas e arbóreas, como graviola, cafeeiro, jambeiro, mangueira, biribá, umari, sumaúma, sorva, jenipapo e carambola, causando desfolhamento (Gasparotto *et al.*, 1999). Os sintomas são muito semelhantes entre as dezenas de hospedeiros. Inicialmente, caracterizam-se por manchas necróticas circulares, com o centro marrom-claro, bordos bem definidos, de tonalidade marrom-escuro, e diâmetro de aproximadamente 4 mm. Posteriormente, as manchas tornam-se irregulares, dispersas sobre o limbo foliar, com numerosos halos concêntricos estreitos, constituídos por linhas marrons que contrastam com um fundo marrom mais claro e atingem até 6 cm de diâmetro. Na face abaxial da região da área lesionada, observam-se, a olho nu, numerosos propágulos vegetativos semelhantes a finas e curtas agulhas brancas, com até 0,2 mm de diâmetro e 1 mm a 4 mm de comprimento. Em folhas doentes e caídas no chão, sob condições de elevada umidade, a face abaxial da folha fica recoberta por um micélio branco com produção abundante de propágulos vegetativos e escleródios. Os escleródios são relativamente grandes com até 15 mm de diâmetro, produzidos isolados ou agrupados, globosos, inicialmente marrom-claros e mais escuros quando maduros.

Guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)

Antracnose: o agente causal *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque foi descrito por Albuquerque (1961). É a principal doença do guaranazeiro, causando danos significativos às plantas e à produção. Está distribuída em toda a região Amazônica (Trindade *et al.*, 2016). O patógeno infecta folhas e caules tenros em todos os estádios de crescimento das plantas, causa necrose dos limbos e pecíolos das folhas e das hastes em início de desenvolvimento. As partes necrosadas adquirem coloração marrom-avermelhada. Os folíolos, à medida que secam, tornam-se quebradiços. Lesões isoladas apresentam formato variável de circular a elíptico. O coalescimento das lesões acarreta a queima de extensas áreas dos folíolos com maior predominância em seus bordos. Quando a lesão afeta as nervuras, provoca deformação e enrolamento dos folíolos, principalmente quando jovens. Quando as condições climáticas são muito favoráveis, a doença acarreta a queda de grande número de folhas, seca descendente dos galhos e, conseqüentemente, morte da planta (Albuquerque, 1961).

Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex Spreng.)

Vassoura de bruxa: é a doença mais relevante economicamente, pois reduz drasticamente a produção de frutos, podendo causar perdas totais. O agente causal é o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, cuja incidência, extremamente elevada em plantios na Amazônia, inviabiliza a produção dos clones suscetíveis. A enfermidade afeta órgãos jovens, como brotações, flores e frutos, ocorrendo em mudas e plantas adultas nas quais se observam os sintomas de superbrotamento característicos da doença. Inicialmente, devido à hipertrofia do tecido afetado, há engrossamento dos ramos bem como emissão excessiva de brotações laterais, cujas folhas apresentam crescimento reduzido. Nessa fase, a brotação infectada apresenta coloração marrom-clara (vassoura verde) que se destaca em relação ao verde da copa. Posteriormente, há seca do ramo doente, cujo aspecto característico é aquele que deu nome à moléstia. Nas vassouras verdes de plantas adultas, na época de floração, verifica-se abundante emissão de botões florais, com posterior aborto das flores. Nos frutos

jovens, há paralisação do crescimento e mumificação. Quando a doença afeta os frutos em fase adiantada de desenvolvimento, observam-se lesões escuras na casca, que correspondem internamente à região de apodrecimento da polpa, a qual passa da coloração creme normal para marrom. Geralmente, não ocorre apodrecimento da semente (Gasparotto & Pereira, 2016).

Castanhaeira do Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)

Podridão das castanhas: causada pelos fungos *Aspergillus flavus* L. e *A. parasiticus* Speare que se desenvolvem sobre os ouriços da castanhaeira do Brasil no período entre a queda dos frutos e a coleta. Quando as condições de armazenamento dos ouriços ou das castanhas são inadequadas, favorecem a proliferação desses patógenos habitantes naturais do solo, em função da umidade excessiva. Os patógenos colonizam as castanhas e contaminam-nas, com a produção de aflatoxinas. Aflatoxinas são micotoxinas, com ação carcinogênica e tóxicas para os seres humanos e animais. As castanhas contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus* spp. apresentam as superfícies externa e interna da casca recobertas parcial ou totalmente por estruturas (micélio e conídios) do patógeno, de coloração esbranquiçada, creme ou amarelada. O fungo esporula no interior da castanha e coloniza os tecidos causando o apodrecimento da amêndoa, que apresenta coloração esbranquiçada, esverdeada ou amarelada, não podendo, nesse caso, serem usadas na alimentação humana e/ou animal.

Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Mela ou murcha da teia micélica: causada pelo fungo *T. cucumeris*, é o principal patógeno do feijoeiro na região Amazônica. A doença manifesta-se, inicialmente, como manchas encharcadas nas folhas, circundadas por uma área marrom-escura, seguida de intensa produção de um entrelaçado de micélio que atinge as folhas adjacentes, hastes, flores e vagens. A teia micélica, que interliga as folhas com as outras partes da planta, mantém as folhas completamente mortas aderidas ao caule e aos ramos, com grande número de escleródios formados sobre os tecidos mortos, cuja produção é abundante, e constituem-se em focos secundários de infecção ou permanecem no solo como inóculo primário para o feijoeiro ou outros hospedeiros.

Pimenta do reino (*Piper nigrum* L.)

Fusariose: a doença foi constatada no Pará, na década de 1960, e já dizimou mais de 20 milhões de plantas. Causada pelo fungo *Fusarium solani* f.sp. *piperis* Albuq., é a principal doença da pimenta do reino no Brasil. Quando o fungo ataca as raízes, as folhas ficam amarelas e flácidas, levando ao secamento da planta. Observam-se também lesões necróticas nas raízes e no caule da planta. Com o avanço da doença, pode ocorrer exsudação negra e brilhante na base da planta. Em condições de alta umidade, peritécios podem ser formados na base do caule e sobre os ramos (Duarte *et al.*, 2016).

Coqueiro (*Cocos nucifera* L.)

Mancha foliar do coqueiro: causada pelo fungo *Bipolaris incurvata* (C. Bernard) Alcorn, ocorre principalmente em plantio com deficiência de potássio. Os sintomas manifestam-se como pequenas lesões arredondadas, com centro marrom-claro, circundadas por um halo amarelo-ouro. Posteriormente, as lesões se expandem, o centro torna-se escuro e com um pequeno halo amarelo, que pode coalescer, apresentando centro esbranquiçado e bordas marrom-escuras. Na folha central recém-emitada, surgem grandes lesões no pecíolo. Ocorre a paralisação do crescimento, culminando com a morte da planta (Gasparotto *et al.*, 1999).

Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Podridão mole de raízes: causada principalmente por *Phytophthora drechsleri* Tucker, é a mais importante doença da mandioca no Norte e Nordeste do Brasil. Inicialmente, ocorre murcha da parte aérea, seguida de secamento descendente dos ramos e queda das folhas. Arrancando-se a planta, a maioria das raízes encontra-se podre. As raízes parcialmente apodrecidas exsudam um líquido de odor fétido.

2. Conclusões

Na região Amazônica, o risco de esses agentes bióticos atingirem níveis de dano é elevado, uma vez que os fatores climáticos não são impeditivos para o estabelecimento dos processos biológicos no ciclo de vida dos patógenos.

É necessário, portanto, avançar nos estudos quanto aos aspectos fitopatológicos, que considerem os fatores edáficos, climáticos, econômicos e sociais para cada sistema de produção.

Agradecimentos

À Embrapa pelo apoio financeiro.

3. Referências

- Albuquerque, F.C. 1961. *Antracnose do Guaraná*. Rio de Janeiro, MA/Serviço de Informações Agrícolas, 22p. (Estudos Técnicos, 18).
- Duarte, M.L.R.; Boari, A.J.; Benchimol, R.L. 2016. Doenças da pimenta-do-reino. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. & (Eds.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres. p.583.
- Gasparotto, L.; Ferreira, A.F.; Santos, A.F.; Pereira, J.C.R.; Furtado, E.L. 2012. Doenças das folhas. In: Gasparotto, L. Pereira, J.C.R. (Ed. técnicos) *Doenças da seringueira no Brasil*. 2. ed. rev. e atual. Brasília, DF: Embrapa, p. 35-176.
- Gasparotto, L.; Hanada, R.E.; Albuquerque, F.C.; Duarte, M.L.R. 2001. Mancha-areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em mogno africano. *Fitopatologia Brasileira*, 26:660-661.
- Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R.; Hanada, R.E.; Montarroyos, A.V.V. 2006. *Sigatoka-negra da bananeira*. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental, 177 p.
- Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. Arruda, M.R. 2016. Doenças bióticas. In: Gasparotto, L. Pereira, J.C.R. (Eds.). *Manual de identificação de doenças e pragas da cultura da bananeira*. Brasília, DF: Embrapa, p. 17-50.
- Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. 2016. Doenças das fruteiras da Amazônia. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. & (Eds.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres. p.401-411.
- Gasparotto, L.; Verás, S.M. 1999. Hospedeiros de *Sclerotium coffeicola* no estado do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, n. 1, p. 93.
- Hora Júnior B.Td.; de Macedo D.M; Barreto R.W; Evans H.C; Mattos C.R.R.; Maffia LA. (2014). Erasing the Past: A New Identity for the Damoclean Pathogen Causing South American Leaf Blight of Rubber. *PLoS ONE* 9(8): 104750.
- Junqueira, N.T.V.; Bezerra, J.L. 1990. *Nova doença foliar em seringueira (Hevea spp.)*, causada por *Rosenscheldiella heveae* n.sp. (Loculoascomycetes, Dothideales, Stigmataceae). *Fitopatologia Brasileira*, 15:24-28.
- Kotzé, J.M. *Epidemiology and control of Citrus Black Spot in South Africa*. *Plant Disease*, 65:945-950,1981.
- Pereira, J.C.R.; Gasparotto, L.; Coelho, A.F.S.; Urban, A. 1998. *Ocorrência da Sigatoka-negra no Brasil*. *Fitopatologia Brasileira*, 23 (Suplemento):295, Resumo.
- Pereira, J.C.R.; Gasparotto, L.; Coelho, A.F.S.; Verás, S.M. 2000. *Doenças da bananeira no estado do Amazonas*. 2.ed. rev. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental, 27p. (Circular Técnica, 7).
- Trindade, D.R.; Poltronieri, L.S; Araújo, J.C. A. 2016. Doenças do guaranazeiro. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. & (Eds.) *Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres. p.473-483.

Diversidade de Hypoxylaceae na Amazônia Brasileira: Situação atual e expectativa futura para o estudo da família

CRUZ, Kely da Silva¹; JESUS, Maria Aparecida²; SOUZA, Antônia Queiroz Lima³; SALES-CAMPOS, Ceci²

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte da Amazônia Legal, Universidade do Estado do Amazonas

² Pesquisadoras, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

³ Professora, Universidade Federal do Amazonas

Emails: cruzsk@outlook.com, ranna@inpa.gov.br, ceci@inpa.gov.br, antoniaqlsouza@gmail.com.

Resumo

Hypoxylaceae foi recentemente segregada da família Xylariaceae com base em análises filogenéticas, estudos quimiotaxonômicos e taxonomia clássica. Hypoxylaceae compreende aproximadamente 19 gêneros, caracterizados por um estroma peritecial unipartido, geralmente com presença de pigmento estromático e anamorfo do tipo *Nodulisporium*. Os fungos hypoxylaceos são encontrados como saprofitos e endofíticos e estão amplamente distribuídos em climas tropical, subtropical e temperados. Algumas espécies apresentam ação antifúngica, antimicrobiana e citotóxica. A diversidade de Hypoxylaceae deve ser analisada verificando as espécies de fungos pertencentes à Xylariaceae, pois os herbários brasileiros ainda não estão atualizados. O levantamento da diversidade de Xylariaceae/Hypoxylaceae foi realizado através do Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas (speciesLink) e no <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br>. Os principais herbários do Brasil onde há registros da família Xylariaceae são: INPA-FUNGOS/Manaus-AM (1041), UFACPZ/Rio Branco-AC (6), HFSL-FUNGOS/Porto Velho-RO (46), Museu Paraense Emílio Goeldi/Belém-PA (27), MBML-HERBARIO/Santa Teresa-ES (2), UFRN-FUNGOS/Rio Grande do Norte-RN (3), JBP/João Pessoa-PB (47), URM/Recife-PE (807), ALCB/Salvador-BA (89), SP-FUNGI/São Paulo-SP (652), UCP/Palotina-Paraná (84), FLOR/Santa Catarina-SC (188), ICN/Porto Alegre-RS (11), HUCS-MICOTECA/Caxias do Sul-RS (46), totalizando 3.049 registros, sendo 694 Hypoxylaceae. Destes, somente 205 pertence à Amazônia brasileira. Não há registro de Hypoxylaceae nos herbários de Roraima, Amapá, Tocantins e Mato Grosso. Diante do exposto, é possível perceber que os fungos hypoxylaceos são pouco estudados na região Amazônica, levando em consideração que a região representa uma das maiores biodiversidades de organismos do mundo. Em vista disto, acredita-se que a divulgação desses dados possa despertar interesse nos taxonomistas para o estudo de Hypoxylaceae e assim incrementar os acervos da região Amazônica brasileira.

Palavras-chave: Biodiversidade, Metabólitos secundários, Taxonomia.

1. Introdução

A família Xylariaceae compreendia aproximadamente 80 gêneros, representando uma das maiores famílias de Ascomycota não liquenizados. Porém, a posição filogenética dos gêneros dentro dessa família não estava bem definida. Wendt *et al.* (2017) e Daranagama *et al.* (2018) segregaram os gêneros de Xylariaceae, com base em análises filogenéticas, estudos quimiotaxonômicos e taxonomia clássica e propuseram uma nova família, a Hypoxylaceae (Tabela 1).

Os gêneros com estroma bipartido, sem pigmento estromático e anamorfo do tipo *Nodulisporium* (*Biscogniauxia*, *Camillea*, *Obolarina* e *Vivantia*) foram acomodados em *Graphostromataceae* (M.E. Barr, J.D. Rogers & Y.-M. Ju.) emend. M. Stadler, L. Wendt and Sir., essa família forma um clado basal para os fungos xylarioides. Portanto, somente os gêneros sem pigmento estromático e anamorfodo tipo *Geniculosporium* permaneceram dentro de *Xylariaceae* (Tul. & C. Tul.) emend. M. Stadler & L. Wendt. Os demais gêneros sem os caracteres mencionados acima foram alocados para *Lopadostomataceae* ou Xylariales (gêneros incertos).

Hypoxylaceae compreende 19 gêneros com ascoma peritecial, de coloração principalmente negra (Figura 1) (Rogers, 2000; Daranagama *et al.*, 2018). Os fungos hypoxylaceous geralmente liberam pigmentos estromáticos em KOH 10%. No peritécio estão inseridos os ascos (estrutura de reprodução) cilíndricos com um aparato apical no ápice, que se torna amiloide (azul) quando corado com reagente de Melzer. Dentro dos ascos estão os ascósporos unicelulares, geralmente elipsóide-inequilateral, com pigmentação marrom e fenda germinativa que varia de retilínea a sigmoide.

A família Hypoxylaceae está amplamente distribuída em áreas de climas tropical, subtropical e temperada (Kuhnert *et al.*, 2017). Suas espécies são saprotróficas e endofíticas, menos frequente como parasitas facultativos (Kuhnert *et al.*, 2016; Sir *et al.*, 2016).

As espécies de Hypoxylaceae produzem uma diversidade de metabólitos secundários com atividade antifúngica, antimicrobiana e citotóxica (Stadler, 2011). A cada ano, novos metabólitos secundários bioativos estão

Tabela 1. Classificação dos gêneros dentro de Xylariales (Daranagama *et al.*, 2018).

Xylariaceae	Hypoxylaceae	Graphstromataceae	Lopadostomataceae
<i>Amphirosellinia</i>	<i>Alloanthostomella</i>	<i>Biscogniauxia</i>	<i>Creosphaeria</i>
<i>Anthostomella</i>	<i>Annulohypoxylon</i>	<i>Camillea</i>	<i>Lopadostoma</i>
<i>Anthostomelloides</i>	<i>Anthocanalis</i>	<i>Graphostroma</i>	<i>Jumillera</i>
<i>Ascotricha</i>	<i>Chlorostroma</i>	<i>Obolarina</i>	<i>Whalleya</i>
<i>Astrocystis</i>	<i>Daldinia</i>	<i>Theissenia</i>	
<i>Brunneiperidium</i>	<i>Entonaema</i>	<i>Vivantia</i>	
<i>Clypeosphaeria</i>	<i>Hypoxylon</i>		
<i>Collodiscula</i>	<i>Hypomontagnella</i>		
<i>Coniolaria</i>	<i>Jackrogersella</i>		
<i>Emarcea</i>	<i>Neoanthostomella</i>		
<i>Engleromyces</i>	<i>Pseudoanthostomella</i>		
<i>Entoleuca</i>	<i>Phylacia</i>		
<i>Euepoxylon</i>	<i>Pyrenomyxa</i>		
<i>Gigantospora</i>	<i>Pyrenopolyporus</i>		
<i>Halorosellinia</i>	<i>Rhopalostroma</i>		
<i>Helicogermisli</i>	<i>Rostrohypoxylon</i>		
<i>Hypocopra</i>	<i>Ruwenzoria</i>		
<i>Hypocreodendron</i>	<i>Thamnomycetes</i>		
<i>Kretschmaria</i>	<i>Thuemenella</i>		
<i>Kretschmariella</i>			
<i>Leprieuria</i>			
<i>Lunatiannulus</i>			
<i>Nemania</i>			
<i>Nipicola</i>			
<i>Podosordaria</i>			
<i>Poronia</i>			
<i>Rosellinia</i>			
<i>Sabalicola</i>			
<i>Spirodecospora</i>			
<i>Sarcoxydon</i>			
<i>Squamotubera</i>			
<i>Stilbohypoxydon</i>			
<i>Striatodecospora</i>			
<i>Vamsapriya</i>			
<i>Virgaria</i>			
<i>Wawelia</i>			
<i>Xilaria</i>			
<i>Xylotumulus</i>			

sendo obtidos do ascoma e da cultura micelial (Karwehl e Stadler, 2016). De acordo com Stadler *et al.* (2014), os perfis metabólicos secundários em Hypoxylaceae apresentam um valor taxonômico, corroborando com os dados filogenéticos e a taxonomia clássica destes fungos.

A floresta Amazônica brasileira abriga uma diversidade de fungos pouco estudada no Brasil. Em vista disso, este trabalho propõe conhecer a diversidade de Hypoxylaceae no Brasil e na região Amazônica brasileira.



Figura 1. Gêneros de Hypoxylaceae, A. *Thamnomycetes*-ascoma ereto e ramificado; B. *Hypoxylon*-ascoma peltado; C. *Hypoxylon*-ascoma efuso-pulvinado; D. *Phylacia*-ascoma piriforme; E. *Daldinia*-ascoma globoso; F. *Hypoxylon*-ascoma efuso-pulvinado.

2. Metodologia

A análise da diversidade de Hypoxylaceae foi baseada no registro das espécies de fungos pertencentes à Xylariaceae, tendo em vista que os herbários brasileiros ainda não estão atualizados de acordo com a nova classificação de Wendt *et al.* (2017) e Daranagama *et al.* (2018). O levantamento da diversidade de Xylariaceae/Hypoxylaceae foi realizado através do Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas (species-Link), pois neste sistema estão cadastrados os principais herbários brasileiros e, no site <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br>. Somente o herbário HCP/Palotina-Paraná não está cadastrado ainda no speciesLink. Os principais

herbários do Brasil onde há registros da família Xylariaceae foram: INPA-FUNGOS/Manaus-AM, UFACPZ/Rio Branco-AC, HFSL-FUNGOS/Porto Velho-RO, Museu Paraense Emílio Goeldi/Belém-PA, MBML-HERBARIO/ Santa Teresa-ES, UFRN-FUNGOS/Rio Grande do Norte-RN, JBP/João Pessoa-PB, URM/Recife-PE, ALCB/Salvador-BA, SP-FUNGI/São Paulo-SP, HCP/Palotina-Paraná, FLOR/Santa Catarina-SC, ICN/Porto Alegre-RS, HUCS-MICOTECA/Caxias do Sul-RS.

3. Resultados e Discussão

De acordo com os dados pesquisados no Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas (speciesLink), o número de amostras de Xylariaceae no Brasil totaliza 3.049 (Figura 2). Os herbários INPA-FUNGOS (1041), URM (807) e SP-FUNGI (652) representam 82% das amostras de Xylariaceae. Porém, quando analisadas as amostras de Hypoxylaceae, verifica-se que o número de amostras totaliza apenas 694 (Figura3), distribuídas nos herbários URM (247), INPA-FUNGOS (195) e SP-FUNGI (135). O número maior de amostras no herbário URM deve-se as amostras provenientes dos trabalhos de Pereira *et al.* (2008a, 2008b, 2009, 2010) e Poroca (1986) no Nordeste. No Brasil, micólogos e estudiosos de fungos contribuíram no estudo da Hypoxylaceae, entre os quais se destacam Silveira e Rodrigues (1985) e Yuyama *et al.* (2013) no Norte. A região Sul foi a mais explorada com estudos realizados por Meijer (2006, 2010), Theissen (1909, 1910), Rick (1905, 1906, 1931), Trierveiler-Pereira (2014) e Cruz e Cortez (2015 e 2016).

Os herbários INPA-FUNGOS, URM e SP-FUNGI são os mais representativos com depósitos de Xylariaceae e Hypoxylaceae no Brasil. Dos herbários amostrados para a região Amazônica, não há registro dessas famílias no Estado de Roraima, Amapá, Tocantins e Mato Grosso. Tendo em vista a riqueza que essa região representa, se faz um alerta para que possam ser feitos estudos nessa região, a fim de conhecer a diversidade dessa família e estudar o seu potencial biotecnológico.

Segundo a Lista de Espécies da Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>) e artigos publicados recentemente por Cruz e Cortez (2015, 2016), verifica-se que para o Brasil são relatados sete gêneros de Hypoxylaceae que compreendem aproximadamente 70 espécies: *Annulohypoxylon* Y.M.Juet *et al.* (17), *Daldinia* Ces. & De Not. (4), *Entonaema* Möller (1), *Hypoxylon* Bull. (37), *Phylacia* Lév. (6), *Rhopalostroma* D. Hawksw. (1) e *Thamnomycetes* Ehrenb. (4) amplamente distribuídas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste, Nordeste (Figura 4).

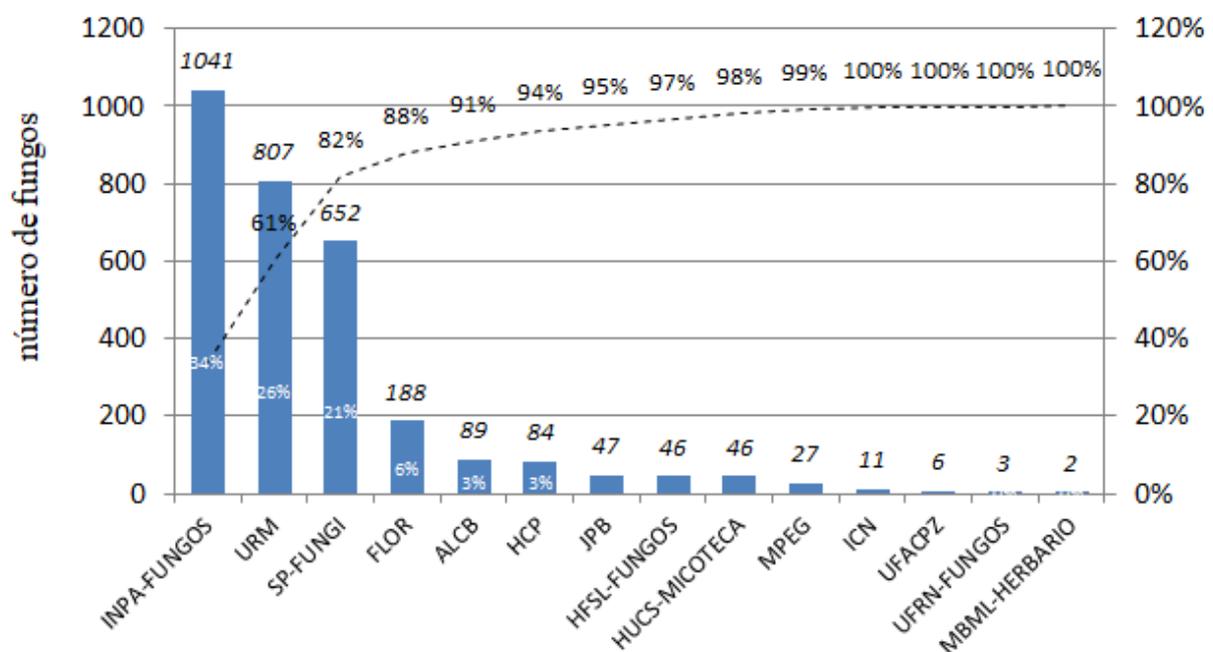


Figura 2. Relação do número de amostras de Xylariaceae nos herbários brasileiros.

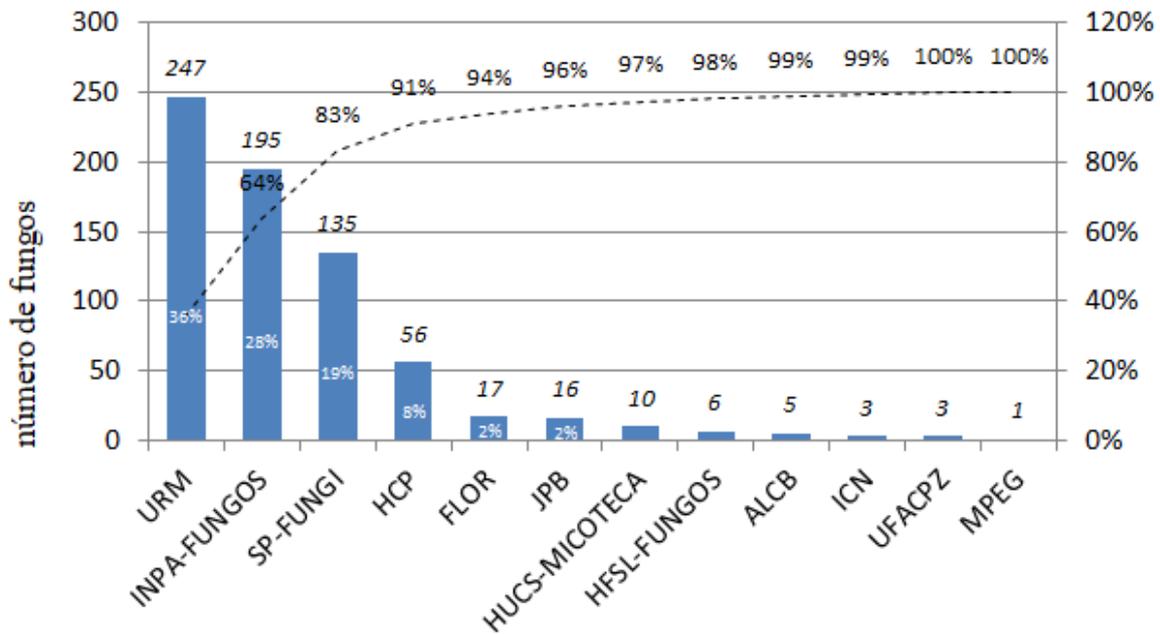


Figura 3. Relação do número de amostras de Hypoxylaceae nos herbários brasileiros.

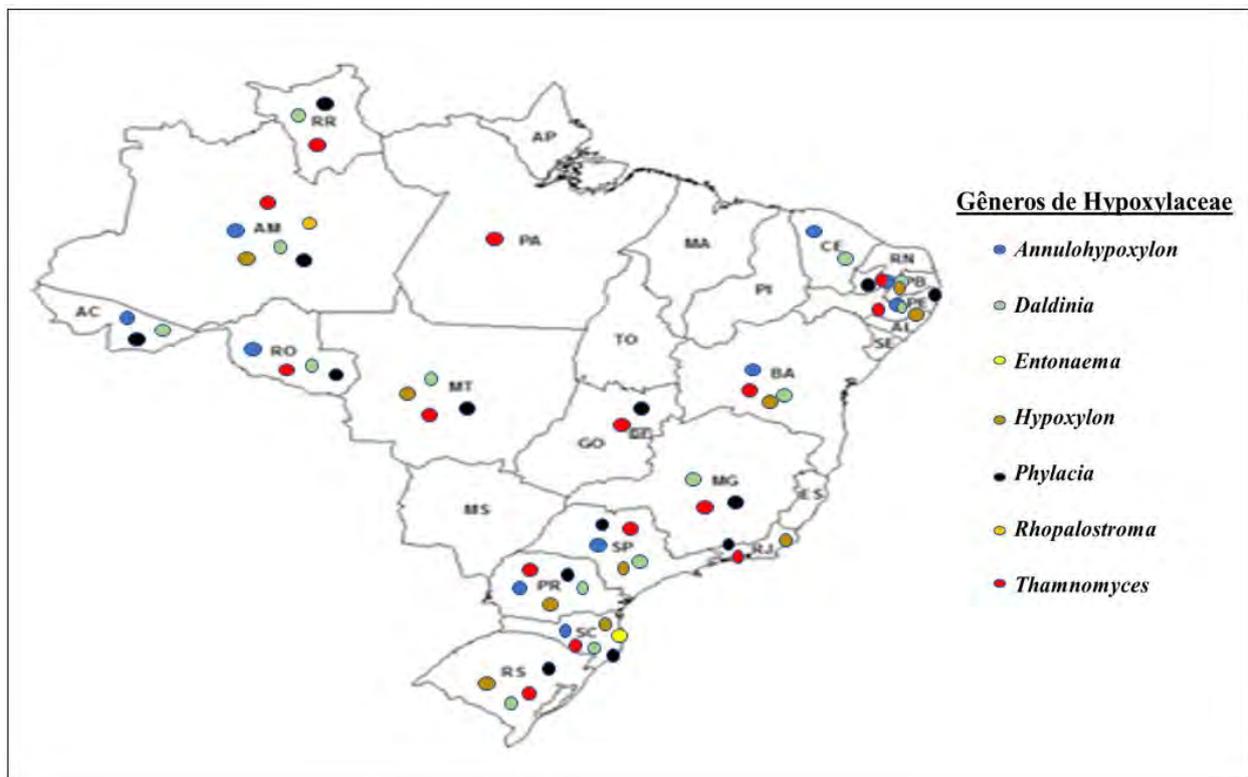


Figura 4. Mapa da distribuição dos gêneros de Hypoxylaceae no Brasil.

Conforme a (Figura 5) *Hypoxylon* representa 50% dos gêneros de Hypoxylaceae no Brasil. No entanto, quando comparado com outros gêneros de ocorrência na região Amazônica, *Thamnomycetes* é o gênero mais representativo (Figura 6). Isso se deve ao fato de *Thamnomycetes* apresentar ascoma mais robusto, sendo melhor visível em campo do que *Hypoxylon*.

Um total de 694 amostras Hypoxylaceae consta nos herbários do Brasil. No entanto, observa-se que a região Amazônica possui 205 amostras desse total (Figuras 5 e 6). Esses dados mostram que a região Amazônica representa 30% da amostragem de Hypoxylaceae, um número bem abaixo do que realmente essa região possa apresentar, levando em consideração seu imenso território.

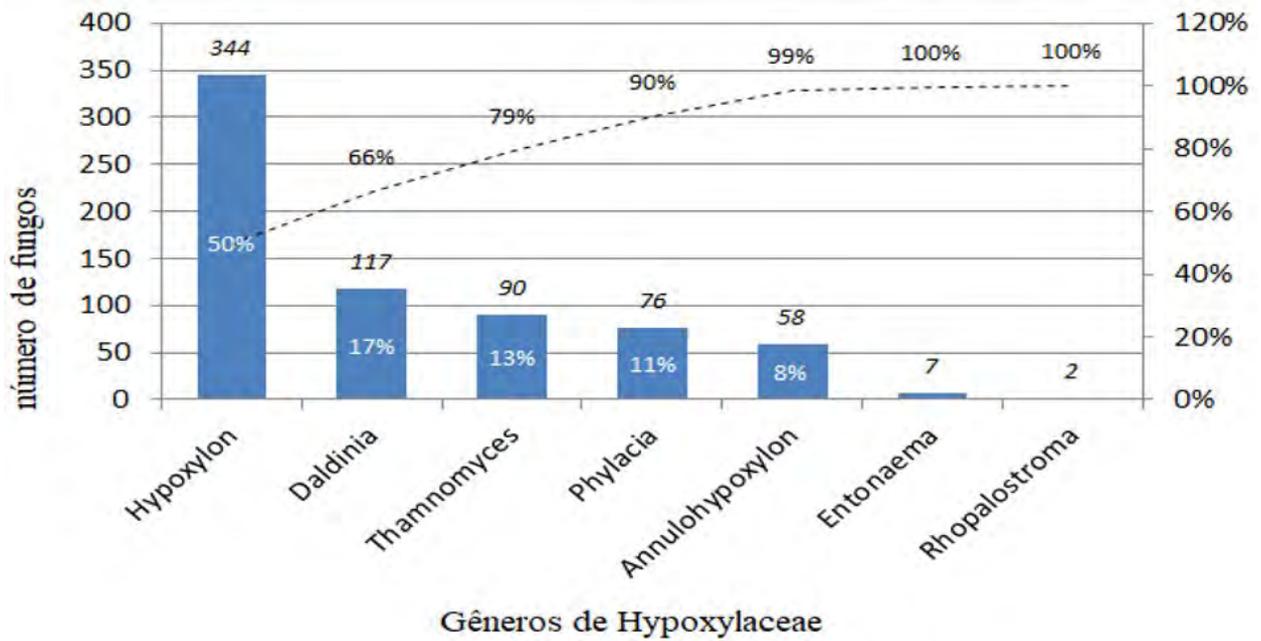


Figura 5. Representação dos gêneros de Hypoxylaceae que ocorrem no Brasil.

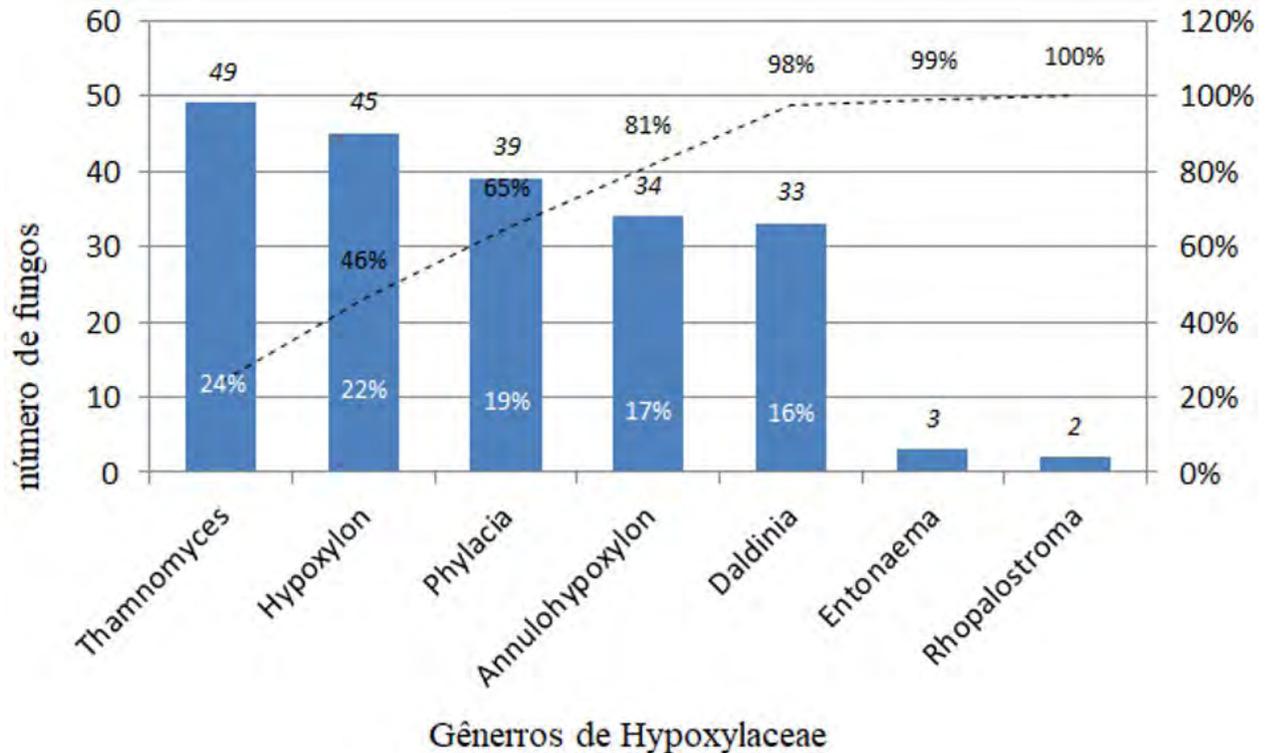


Figura 6. Representação dos gêneros de Hypoxylaceae que ocorrem na Amazônia brasileira.

4. Conclusões

Os herbários mais representativos com amostras de Xylariaceae e Hypoxylaceae tanto no Brasil quanto na Amazônia brasileira são: INPA-FUNGOS/Manaus-AM, URM/Recife-PE e SP-FUNGI/São Paulo-SP.

Os gêneros mais representativos no Brasil são *Hypoxylon*, *Daldinia* e *Thamnomycetes*.

Os gêneros mais representativos na Amazônia brasileira são *Thamnomycetes*, *Hypoxylon* e *Phylacia*.

Hypoxylaceae está pouco representada nos herbários da Amazônia brasileira. Portanto, essa região necessita de mais estudos.

5. Referências

- Cruz K.S., Cortez V.G. 2015. *Hypoxylon* (Xylariaceae, Ascomycota) from Western Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 38 (4): 889–901.
- Cruz K.S., Cortez V.G. 2016. *Annulohypoxylon* (Xylariales) from western Paraná, Brazil. *Mycotaxon*, 131: 395–402.
- Daranagama D.A., Hyde K.D., Sir E.B., Thambugala K.M., Qing T.Q., Samarakoon M.C., McKenzie E.H.C., Jayasiri S.C., Tibpromma S., Bhat J.D., Liu X., Stadler M. 2018. Towards a natural classification and backbone tree for Graphostromataceae, Hypoxylaceae, Lopadostomataceae and Xylariaceae. *Fungal Diversity*. 88:1–165.
- Ju Y.M., Rogers J.D. 1996. A revision of the genus *Hypoxylon*. *Mycologia* Memoir no. 20. St. Paul, MN, APS Press. 365.
- Karwehl S., Stadler M. 2016. Exploitation of Fungal Biodiversity for Discovery of Novel Antibiotics. In: Stadler M., Dersch P. (eds) How to Overcome the Antibiotic Crisis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 398. Springer, Cham.
- Kuhnert E., Sir E.B., Lambert C., Hyde K.D., Hladki A.I., Romero A.I., Rohde M., Stadler M. 2016. Phylogenetic and chemotaxonomic resolution of the genus *Annulohypoxylon* (Xylariaceae) including four new species. *Fungal Diversity*, DOI 10.1007/s13225-016-0377-6.
- Kuhnert E., Surup F., Halecker S., Stadler M. 2017. Minutellins A – D, azaphilones from the stromata of *Annulohypoxylon minutellum* (Xylariaceae). *Phytochemistry*, 137: 66–71.
- Meijer A.A.R. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal*, 68: 1–55.
- Meijer A.A.R. 2010. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná: corrections and updating. *Boletim do Museu Botânico Municipal*, 72: 1–9.
- Pereira J., Bezerra J.L., Maia L.C. 2008a. Revision of taxa of the URM Herbarium two *Hypoxylon* species described by A.C. Batista. *Mycotaxon*, 104: 405–408.
- Pereira J., Bezerra J.L., Maia L.C. 2008b. *Kretzschmaria albogrisea* sp. nov. and *K. curvirima* from Brazil. *Mycotaxon*, 106: 237–241.
- Pereira J., Rogers J.D., Bezerra J.L. 2009. New Xylariaceae taxa from Brazil. *Sydowia*, 61: 321–325.
- Pereira J., Rogers J.D., Bezerra J.L. 2010. New *Annulohypoxylon* species from Brazil. *Mycologia*, 102: 248–252.
- Poroca D.J.M. 1986. Revisão histórica das Xylariaceae do Brasil. *Boletín micológico*, 15: 41–53.
- Rick J. 1931. Monographia das *Hypoxyleas* riograndenses. *Brotéria*, 25: 21–50.
- Rick J. 1935. Monographia das *Xylariaceas* riograndenses. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 36: 41–71.
- Rogers J.D. 2000. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycological Research*, 104 (12): 1412–1420.
- Silveira V.D., Rodrigues, K. F. 1985. Levantamento preliminar de Xylariaceae na Amazônia. *Acta Amazonica*, 15: 7–27.
- Sir E.B., Kuhnert E., Lambert C., Hladki A.I., Romero A.I., Stadler M. 2016. New species and reports of *Hypoxylon* from Argentina recognized by a polyphasic approach. *Mycological Progress*, 15 (42): 2–19.
- Stadler M. 2011. Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 1 (2): 75–133.

- Stadler M., Læssøe T., Fournier J., Decock C., Schmieschek B., Tichy Hans-V., Peršoh D. 2014. *A polyphasic taxonomy of Daldinia (Xylariaceae)*. *Studies in Mycology*, 77: 1–143.
- Species Link. 2002 (continuamente atualizado). Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas. INCT-Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. Brasil, Disponível em: <<http://inct.splink.org.br/>> Acesso em: 10 Jul. 2019.
- Theissen F. 1910. Fungi riograndenses. *Beihfte zum Botanischen Centralblatt*, 27: 384–411.
- Trierveiler-Pereira L. 2014. Ascomycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from Brazil: New records and distributional data. *Lilloa*, 51 (1): 108–115.
- Wendt L., Sir E.B., Kuhnert E., Heitkämper S., Lambert C., Hladki A.I., Romero A.I., Luangsa-ard J.J., Srikitikulchai P., Peršoh D., Stadler M. 2017. Resurrection and emendation of the Hypoxylaceae, recognised from a multigene phylogeny of the Xylariales. *Mycological Progress in press* (DOI:10.1007/s11557-017-1311-3).
- Xylariales in Flora do Brasil*. 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB26>>. Acesso em: 10 Jul. 2019.
- Yuyama K.T. Pereira J., Maki C.S., Ishikawa N.K. 2013. *Daldinia eschscholtzii* (Ascomycota, Xylariaceae) isolated from the Brazilian Amazon: taxonomic features and mycelial growth conditions. *Acta Amazonica*, 43: 1–8.



Realização



UNIDADE DE PESQUISA DO

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

Embrapa

Amazônia Ocidental



Apoio



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



CAPES



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Empresa Estadual de
Turismo do Amazonas

Agência



Publicidade e Eventos



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

Secretaria de
Desenvolvimento
Econômico, Ciência,
Tecnologia e Inovação



AMAZONAS
GOVERNO DO ESTADO

ISBN: 978-85-211-0199-4



9 788521 101994

